

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE
VARIEDADES DE INJERTO (*Pouteria viridis*) QUE SE CULTIVAN
EN TRES REGIONES DE GUATEMALA.

Informe de Tesis

Presentado por

Ana Lucía Pineda Villeda

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, Agosto del 2005.

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Licda Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Juan Francisco Carrascoza Mayen	Vocal IV
Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro	Vocal V

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	ANTECEDENTES	
	A. Radicales Libres	5
	B. Antioxidantes	8
	C. Estudios Relacionados	15
	D. Sapotáceas y su importancia	18
IV.	JUSTIFICACIÓN	22
V.	OBJETIVOS	23
VI.	HIPÓTESIS	24
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	
	A. Universo de Trabajo	25
	B. Muestra	25
	C. Materiales	25
	D. Métodos	28
	E. Diseño de la Investigación	34
VIII.	RESULTADOS	36
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
X.	CONCLUSIONES	47
XI.	RECOMENDACIONES	48
XII.	REFERENCIAS	49
XIII.	ANEXOS	53

I. RESUMEN

En el presente estudio se determinó la cantidad de sustancias antioxidantes presentes en frutos de injerto (*Pouteria viridis*) cultivados en tres zonas de vida de Guatemala; para ello se colectaron diez frutos de un árbol ubicado en cada una de las siguientes localidades: Cobán y San Juan Chamelco, Departamento de Alta Verapaz (zona de vida bosque húmedo subtropical frío), Chimaltenango y San Andrés Itzapa, Departamento de Chimaltenango (bosque húmedo montano bajo subtropical), y Antigua Guatemala, Departamento de Sacatepéquez y Nueva Santa Rosa, Departamento de Santa Rosa (bosque húmedo subtropical templado). De cada fruto se obtuvo un extracto etanólico, en el cual se determinó por duplicado los siguientes parámetros: actividad antioxidante total mediante el método del α, α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH), contenido de fenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteu y concentración de vitamina C mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los frutos colectados en el bosque húmedo subtropical templado presentaron los mayores contenidos de sustancias antioxidantes (actividad antioxidante total con IC_{50} de 10.88 ± 1.95 mg, fenoles totales de 6.23 ± 0.7 mg equivalentes de ácido gálico/g, y vitamina C de 1.14 ± 0.11 mg ácido ascórbico/g, (resultados expresados en base fresca como media \pm D.S; n = 20). La comparación de los resultados entre las zonas de vida por la prueba de Fisher reveló que los contenidos de sustancias antioxidantes están influidos por la zona de vida de cultivo ($p < 0.00001$); los frutos de las tres zonas de vida poseen diferentes contenidos de actividad antioxidante total ($p < 0.00001$) y vitamina C ($p < 0.0024$), mientras que los fenoles totales de los frutos del bosque húmedo subtropical templado tienen valores distintos a las otras dos zonas de vida ($p < 0.017$). Además, se evidenció diferencias en al menos dos de los parámetros entre las localidades pertenecientes a cada zona de vida: para el bosque húmedo subtropical frío el contenido de fenoles y vitamina C fueron distintos para los frutos de sus dos

localidades; y en las dos regiones restantes actividad antioxidante total y vitamina C presentaron diferencias.

La variación del contenido de los parámetros medidos se debió principalmente al genotipo de la fruta, ya que se observó diversidad en su apariencia. El estudio permitió establecer la diferencia en el contenido de las sustancias antioxidantes medidas, a su vez la identificación de la región en donde se cultivan los frutos con las mejores propiedades antioxidantes.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades degenerativas e inflamatorias están relacionadas con entidades químicas llamadas radicales libres, los cuales son sustancias inestables que poseen un electrón desapareado en su orbita y suelen reaccionar con sustancias orgánicas afectando su estructura y función (1, 2).

Existen compuestos llamados antioxidantes, que son capaces de inactivar a los radicales libres, actuando como defensa del organismo ante estas sustancias dañinas. Los antioxidantes que se encuentran presentes en el organismo como sistemas o complejos enzimáticos reciben el nombre de antioxidantes endógenos. Los antioxidantes exógenos se pueden ingerir por medio de los alimentos que conforman la dieta (3, 4).

Las fuentes de sustancias antioxidantes son las frutas y las verduras. Según la Organización Mundial de la Salud es recomendable la ingesta de por lo menos 14 onzas diarias de frutas y verduras. Existen en la literatura evidencias de que los antioxidantes pueden prevenir carcinogénesis, inflamación, oxidación de lípidos y aumento de la presión arterial, entre otras patologías (5 - 8).

Guatemala es un país con amplia diversidad de frutas, entre los cuales se encuentra el injerto (*Pouteria viridis*), fruto que pertenece a la familia de las sapotáceas y cuyo valor comercial y nutricional es alto. En Guatemala el injerto se cultiva en tres zonas de vida¹: bosque húmedo subtropical frío, bosque húmedo montano bajo subtropical y bosque húmedo subtropical templado. Las características físicas del injerto dependen de la altura en la que se coseche, así en zonas bajas se obtienen frutos grandes y jugosos con apariencia de zapote y en zonas altas se obtienen frutos pequeños dulces y con epidermis lisa color naranja (9 - 11).

¹ Zona de vida: Unidad de clasificación de los bosques de acuerdo a la temperatura, evapotranspiración y la humedad presentes. (12)

El injerto es poco conocido y por ello poco explotado, actualmente en muchos departamentos donde es posible su cultivo, esta especie ha ido disminuyendo progresivamente siendo sustituido por cultivos de frambuesa, ajo y cardamomo (9 - 11).

La presente investigación se realizó para determinar la capacidad antioxidante total, contenido de fenoles totales y vitamina C presentes en frutos de injerto en tres regiones de cultivo. Con esta información se comprobó que existe diferencia en el contenido de dichas sustancias para cada una de las regiones. Al mismo tiempo, se brindan datos para utilizarse en la revalorización del injerto como un fruto potencialmente explotable.

III. ANTECEDENTES

A. Radicales libres

1. Generalidades:

En el organismo humano el oxígeno es necesario para llevar a cabo reacciones metabólicas, las cuales a su vez produce reacciones de oxido-reducción. En la reducción del oxígeno por medio de la citocromo oxidasa se da la formación de agua, y como producto del oxígeno metabolizado se producen radicales libres. Estas son sustancias químicas que poseen un electrón desapareado en su órbita siendo extremadamente reactivas e inestables. Al contacto con sustancias orgánicas e inorgánicas, los radicales libres afectan las propiedades químicas y funcionales de las sustancias a su alrededor, en especial moléculas que se encuentran en la membrana celular, los ácidos grasos insaturados, proteínas y ácidos nucleicos. Por ello han sido relacionados con diversos procesos patológicos y fisiológicos, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades degenerativas e inflamatorias, entre otras (1 - 4).

Generalmente los radicales libres se forman por transferencia de electrones secundaria a reacciones metabólicas, las tres vías de formación son: 1) por la ruptura homolítica del enlace covalente; 2) por la pérdida de un electrón; y 3) por la adición de un electrón. Las condiciones externas que promueven la producción de radicales libres son: la contaminación, altas temperaturas, radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, rayos X, medicamentos, el humo del tabaco y el smog (13).

2. Fuentes biológicas de radicales libres:

La principal fuente la constituye la mitocondria, ya que durante el proceso de fosforilación oxidativa se genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar ATP, el aceptor final de electrones es el oxígeno, en esta transferencia de electrones se forman varias moléculas con diferente grado de

oxidación, cediendo uno o dos electrones al oxígeno produciendo intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres (14, 15).

Otro lugar de formación de radicales libres lo constituyen algunas organelas, que poseen pequeñas vacuolas llamadas peroxisomas, que contienen sustancias oxidativas y generadoras de H_2O_2 , el cual es depurado por la enzima catalasa transformándola en agua y un radical libre (O^-) (14, 15).

Los leucocitos polimorfonucleares constituyen una fuente importante de radicales libres; cuando se activan por el complemento, interleucinas u otros factores, los leucocitos producen mieloperoxidasa que cataliza la formación de haloides oxidados con alto poder microbicida. Durante la fagocitosis se da la producción del anión superóxido (O_2^-) por medio de una oxidasa que cataliza una reacción en la que emplea el NADPH para reducir el oxígeno molecular (16).

3. Producción de radicales libres

El oxígeno molecular desempeña un papel importante en el organismo; cerca del 2 al 5 por ciento del oxígeno molecular que ingresa al organismo se transforma en un radical libre. Esto se debe a que en las reacciones metabólicas el oxígeno actúa como receptor de electrones, ya que posee dos electrones desapareados con espín paralelo. Si el oxígeno acepta cuatro electrones se produce agua, a esto se le llama reducción tetravalente (15).



Los principales radicales libres que se forman por reacciones donde participa el oxígeno son:

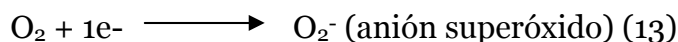
- Radical hidroxilo (OH^-)
- Anión superóxido (O_2^-)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Óxido nítrico (NO^-)

a) Radical hidroxilo(OH⁻): Radical libre con una vida corta, aproximadamente de 10^{-10} a 10^{-11} segundos. La reacción del radical OH⁻ con moléculas orgánicas produce radicales libres secundarios, los cuales son muy reactivos con las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácido desoxirribonucleico (15).

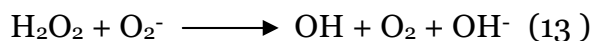
El radical hidroxilo se forma por la reducción trivalente del O₂; de acuerdo a la siguiente ecuación:



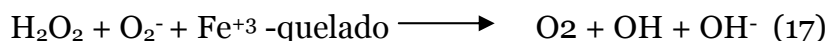
b) Anión superóxido (O₂⁻): Se produce de la reacción univalente del oxígeno molecular (15).



Este proceso fue descrito en 1931 por Haber y Willstater. En 1934, Haber y Weiss descubrieron la reducción secuencial trivalente del O₂ (en combinación con un catalizador en presencia de hierro) la cual da lugar a la producción de intermediarios oxigenados muy reactivos. En el año 1959 McCord y Fridovich aislaron una enzima, la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a partir del anión superóxido. Una acumulación de H₂O₂ conduce a un incremento en la producción de radicales OH⁻ a través de la reacción de Haber-Weiss (17, 18):



Esta reacción es muy lenta y no puede realizarse sin catálisis. Se supone que los iones férricos son los que desempeñan el papel de catalizador:



Esto también puede suceder a través de la reacción de Fenton:



El ion superóxido es producido por células fagocíticas y ayuda a inactivar virus y bacterias. Es mucho menos reactivo que el radical hidroxilo, pero un número importante de blancos biológicos son sensibles a él (19).

c) Peróxido de hidrógeno (H₂O₂): El peróxido de hidrógeno es generado *in vivo* a partir de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa, o a partir de la reducción divalente del oxígeno molecular (15):



El H₂O₂ es una molécula no radical, que se asemeja al agua en su estructura molecular y es muy difusible dentro de la célula. Aunque no es estrictamente un radical libre, se considera como tal por su capacidad de generar el OH⁻ en presencia de metales como el hierro (14).

d) Óxido nítrico: Es de los pocos radicales libres que no son perjudiciales, más bien útiles *in vivo*. El óxido nítrico (NO) es sintetizado a partir del aminoácido l-arginina por las células endoteliales vasculares, fagocitos, algunos tipos de neuronas y otras células. Esta sustancia es un potente agente vasodilatador y puede actuar como neurotransmisor (14, 20).

El óxido nítrico tiene una gran capacidad de reaccionar con el anión superóxido (O₂⁻), sobre todo si se encuentra en exceso en los tejidos. El exceso de NO puede ser tóxico, al dañar por ejemplo, proteínas con centro sulfuro-hierro u otros elementos constituyentes de la membrana celular (14, 20).

B. Antioxidantes

1. Descripción general

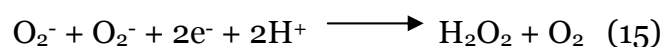
Los antioxidantes son sustancias químicas que inactivan los radicales libres o inhiben su producción, impidiendo así deterioro en las células adyacentes. Los antioxidantes ceden un electrón al radical libre, oxidándose y transformándose en un radical libre débil que es inofensivo, en algunos casos puede llegar a regenerarse como en el caso de la vitamina E (21).

Los antioxidantes que se encuentran normalmente en el organismo se llaman endógenos y generalmente son sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa (mitocondrial, citoplasmática y extracelular), la catalasa y el complejo glutatión peroxidasa (1, 21, 22).

Los antioxidantes exógenos son los que se ingieren con la dieta encontrándose en diversos alimentos como las frutas y verduras (21, 22).

2. Antioxidantes endógenos

a) Superóxido dismutasa (SOD): Metaloenzima que cataliza la reacción de la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno a través de la siguiente reacción (15, 19):

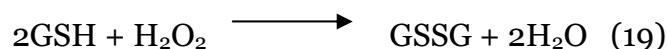


La SOD se ha encontrado en varias formas activas; con manganeso como cofactor localizada en la matriz mitocondrial, y otra conteniendo cobre-zinc localizada en el citoplasma celular. Esta enzima se encuentra presente en todos los organismos animales y vegetales que viven bajo condiciones aeróbicas. La SOD fue la primera enzima de la cual se conoció que actuaba sobre un radical libre. Su descubrimiento en 1968 por McCord y Fridovich, constituyó una prueba de la existencia de los radicales en los organismos vivos (17, 22).

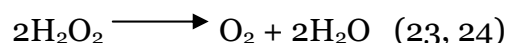
b) Catalasa y glutatión peroxidasa (GP): Conforman el principal sistema enzimático intracelular de remoción de moléculas de peróxido de hidrógeno. La catalasa es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza, se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía según el tejido, se encuentra en concentración elevada en el hígado y los riñones, en menor concentración en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra

en el citosol. La glutatión peroxidasa se encuentra a nivel citosólico y mitocondrial (19).

El mayor riesgo de la presencia del H_2O_2 es la producción del radical $OH\cdot$ que es muy reactivo e inestable. A bajas concentraciones de H_2O_2 , este es removido por la glutatión peroxidasa en presencia de glutatión reducido (GSH), el cual es oxidado hasta glutatión oxidado (GSSG) (19):



Cuando las concentraciones de H_2O_2 son altas, la catalasa se vuelve primordial en su remoción:



3. Antioxidantes exógenos

a) Beta caroteno: Es un precursor de la vitamina A que se halla presente sólo en los alimentos de origen vegetal (figura 1). Los carotenos tienen un efecto favorable para el sistema inmunológico, protegen a la piel contra la radiación ultravioleta, poseen un efecto protector específico de los tejidos. El efecto protector general es mayor cuando todos los carotenos son ingeridos conjuntamente en la dieta. Su función como antioxidante es detoxificar el oxígeno libre reactivo (25, 26).

Las fuentes de betacarotenos son frutas y verduras amarillas y anaranjadas como la naranja, el durazno, el melón, el pomelo, el mango, la zanahoria, el güico y la espinaca. El contenido de betacarotenos de los alimentos puede variar con la estación de cosecha, pues son sensibles a la oxidación, que se acelera por la presencia de luz. Por ser un antioxidante liposoluble su absorción depende del contenido de grasa de la dieta y de la adecuada secreción pancreática y biliar. La ingesta diaria recomendable es de 3 mg (26, 27).

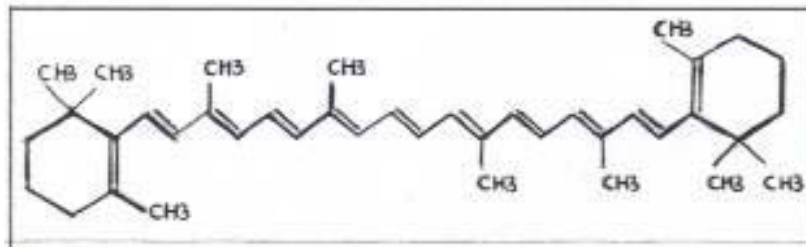


Figura 1. Estructura química del betacaroteno (26).

b) Compuestos fenólicos: Son compuestos producidos por el metabolismo secundario de algunos vegetales. Su estructura base es un núcleo aromático que contiene un grupo hidroxilo libre o sustituido, se diferencian de otros compuestos que también poseen estructura fenólica (monoterpenos) en su origen biosintético. Se originan principalmente a través de dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos (26, 28).

En la ruta del ácido shikímico se utilizan aminoácidos aromáticos como fenilalanina y tirosina para formar los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y derivados, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). Por medio de la ruta de los poliacetatos se originan quinonas, xantonas, orcinoles, etc, aunque algunos compuestos fenólicos como los flavonoides (antocianidinas, catequinas, ácido gálico e isoflavonas) se pueden formar a través de rutas mixtas que combinan la vía del shikimato y del acetatos (figura 2) (26, 27).

Entre las funciones de los compuestos fenólicos está la de proteger al organismo contra enzimas que participan en la inflamación; modifican el metabolismo de las prostaglandinas y por lo tanto protegen de la aglomeración de plaquetas; pueden atrapar hierro y cobre evitando su participación en la producción de radicales libres; donan iones H^+ o electrones para inactivar radicales libres y evitan la peroxidación lipídica protegiendo a la membrana celular de daño estructural que interfiere con el transporte de moléculas a través de estas membranas, además de controlar el crecimiento y proliferación celular (26, 29).

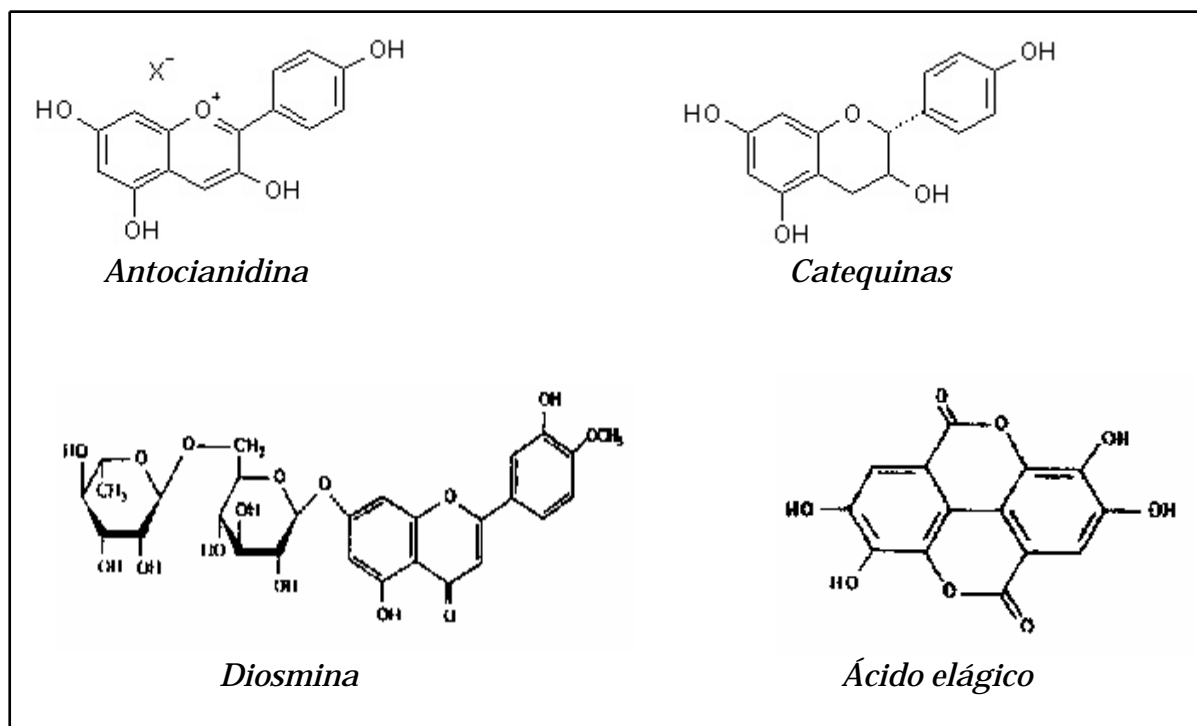


Figura 2. Estructura de algunos fenoles antioxidantes presentes en la dieta (28).

La soya y el tofú son fuentes ricas de flavonoides no cítricos; las frutas cítricas son ricas fuentes de flavonoides cítricos, incluyendo los compuestos diosmina y hesperidina se encuentran en toronjas y naranjas, ver figura 2. El ácido elágico, presente en uvas, fresas, zarzamoras, arándanos, nueces y otros alimentos es un ejemplo de un tipo de compuesto fenólico que actúa como un fitoquímico (26, 27).

c) Vitamina C: También llamada ácido ascórbico, es una vitamina hidrosoluble, constituye uno de los agentes antioxidantes más poderosos que actúa en compartimientos celulares acuosos (figura 3). Su función como antioxidante se basa en su poder para suprimir el oxígeno simple reactivo, reacciona con el anión superóxido, estabiliza el radical hidroxilo y regenera la vitamina E reducida (30, 31).

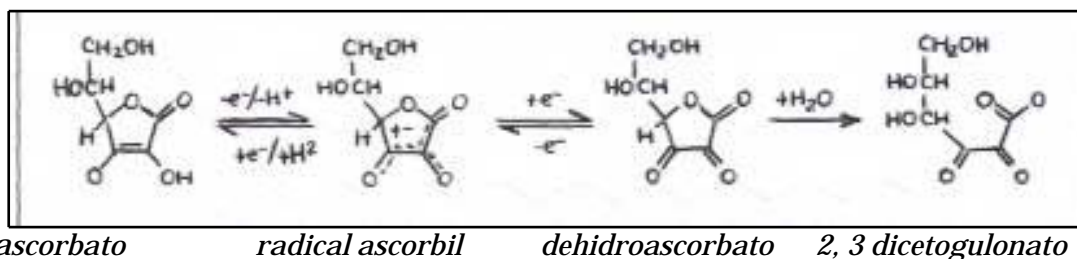


Figura 3. Estructura química de la Vitamina C y sus productos (26)

Cuando se encuentra en solución la vitamina C es fácilmente oxidable, de igual manera si es expuesta a pH alcalino, calor, oxígeno y metales como hierro y cobre (14).

La absorción de la vitamina C ocurre en el duodeno, las cantidades que se ingieren en la dieta tienen una vida corta dentro del organismo, además es excretada por la orina en pequeñas cantidades, por ello debe ingerirse diariamente las dosis para llenar los requerimientos diarios, siendo esta de 60 mg para un adulto. Las frutas más ricas en vitamina C son la acerola y guayaba, aunque también se encuentra en naranja, mandarina, pomelo y vegetales como el tomate, brócoli, pimientos, espinaca y berro. La ingesta de una naranja mediana cubre casi el requerimiento diario de un adulto (27, 32, 33).

d) Vitamina E: Conocido también como tocoferol (figura 4). En la naturaleza existen cuatro isómeros de este compuesto: α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol. La vitamina E es liposoluble, se encuentra en el interior de las membranas citoplasmáticas, actúa como bloqueador de las reacciones redox en cadena evitando la peroxidación lipídica. Se considera como factor de protección en la enfermedad cardiovascular, al evitar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Entre otras acciones la vitamina E también es capaz de neutralizar el oxígeno en singlete y peróxidos, capturar radicales hidroxilo y capturar el anión superóxido (30, 31).

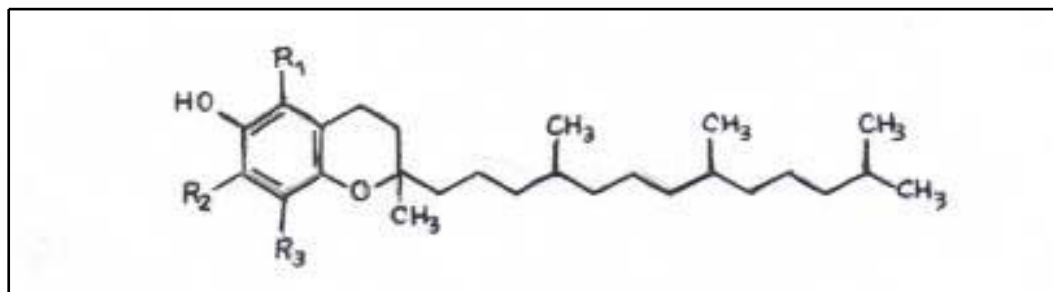


Figura 4. Estructura química de la vitamina E (26).

El aceite de girasol es uno de los alimentos más ricos en vitamina E, aunque también se encuentra abundante en otros aceites vegetales, y germen de trigo (27, 31).

4. Métodos para medir las sustancias antioxidantes

Los métodos para medir las sustancias antioxidantes son:

- La medición de la actividad antioxidante total. Se realiza por un método espectrofotométrico utilizando el reactivo de α,α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH).
- El grupo de fenoles totales es medido a través del método de Folin-Ciocalteu.
- El beta-caroteno y la vitamina C. Se cuantifica a través de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

a) Medición de actividad antioxidante total

Utiliza el reactivo de difenilpicrilhidrazilo (DPPH), el cual reacciona con agentes reductores. Este reactivo es un radical libre estable que al contacto con los antioxidantes puede aceptar un electrón o un radical de hidrógeno. Al aceptar un electrón la solución pierde color estequiométricamente a 517 nm. La actividad se expresa como la cantidad requerida de la materia vegetal para

disminuir en un 50 por ciento la absorbancia comparada con el blanco (IC_{50}) (34).

b) Medición del grupo de los fenoles

Este grupo tan amplio se cuantifica por medio del método de Barnes y colaboradores, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Estos compuestos son determinados por un método colorimétrico cuya absorbancia a 700 nm es proporcional a la cantidad de fenoles presentes en la muestra. Para calcular la concentración se utiliza el ácido gálico como estándar, expresando el contenido total de fenoles como equivalentes de ácido gálico (34).

c) Medición de betacaroteno y vitamina C

Para la medición de betacarotenos y vitamina C, se emplea la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Está es una técnica de separación y cuantificación de sustancias. Utiliza una fase móvil en la cual van diluidos los compuestos a medir, pasan por una fase estacionaria o columna en la cual son retenidos a tiempos establecidos, de manera que un compuesto es identificado según el tiempo de retención en la columna específica. Este aparato es conectado a un detector y a su vez a un integrador que calcula en función de área la concentración del analito (35).

C. Estudios relacionados

1. Antioxidantes y salud humana

En el año de 1969 se comprobó la formación de los radicales libres como subproductos de las reacciones biológicas en las células. Desde entonces se ha estudiado la formación de los elementos reactivos derivados del oxígeno, producidos durante el metabolismo oxidativo y su participación en procesos fisiopatológicos (4, 22).

Se han realizado estudios que comprueban lo beneficioso que es para el organismo una dieta rica en frutas y verduras, tal como recomienda la Organización Mundial de la Salud (5).

En el año 2002 John J.H. estudió la forma en que la ingesta de cinco porciones diarias de frutas y verduras duplica las concentraciones séricas de betacaroteno, alfacaroteno, vitamina C y otros antioxidantes. A su vez esta ingesta disminuye la presión diastólica en 2 mmHg, reduciendo en un 17 por ciento la incidencia de hipertensión, en 6 por ciento en el riesgo de enfermedad coronaria, y de 15 por ciento en el riesgo de accidente cerebrovascular (6).

En la Universidad de Pensilvania, Gutiérrez Maydata en el año 2002 encontró que en adultos sanos, una dieta rica en flavonoides y otros fenoles presentes en el chocolate, reduce la susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) e incrementa las concentraciones de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). El mismo efecto protector a la oxidación de las LDL tiene el licor de cacao en conejos hipercolesterolémicos (7).

Numerosos estudios demuestran una asociación entre el riesgo aumentado de cáncer gástrico y una baja ingesta de frutas y verduras. Los niveles séricos bajos de betacaroteno y la vitamina E, han sido asociados con la displasia gástrica. La infección por *Helicobacter pylori* ha sido asociada con concentraciones más bajas de vitamina C en el contenido intestinal (36).

Los resultados de estudios llevados a cabo en ratas, han demostrado que diosmina y hesperidina, flavonoides presentes en frutas, inhiben la carcinogénesis debido a la reducción de los niveles de poliaminas (37).

En el 2000 Masaki realizó un estudio con 3,385 hombres entre 71 y 93 años, que recibían suplementación con vitamina E y C. Observó que la suplementación con estas vitaminas puede proteger significativamente de

demencia y mejorar la función cognoscitiva en pacientes geriátricos. Sin embargo en este estudio no se observó protección contra la enfermedad de Alzheimer (30).

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han revelado que los antioxidantes como la vitamina A, la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides inducen la diferenciación celular y la inhibición del crecimiento en diferentes grados en las células cancerosas humanas. Además las vitaminas mejoran los efectos inhibidores del crecimiento de la irradiación X, los agentes quimioterapéuticos, la hipertermia y los modificadores de la respuesta biológica sobre las células tumorales. También los antioxidantes reducen la toxicidad de varios agentes terapéuticos antitumorales sobre las células normales (5, 8).

2. Determinación de antioxidantes en alimentos

Los métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales fueron optimizados por Caballeros en el 2,001. Los métodos establecidos fueron: la cuantificación de actividad antioxidante total empleando el reactivo de difenilpicrilhidrazilo (DPPH), y la cuantificación de sustancias fenólicas totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu. Las variables tomadas en cuenta para el estudio fueron: el tipo de materia vegetal para la preparación del extracto (fresca o seca), procesamiento del extracto antes del ensayo (sin evaporar o evaporado) y temperatura de almacenamiento del extracto (congelación o refrigeración) (34).

Barahona y colaboradores en el año 2001 realizaron un estudio en frutas autóctonas de Guatemala, en las cuales se determinó que: la capacidad antioxidante varió de 2.1 mg a 77.2 mg, el contenido de fenoles totales obtenido fue de 17.0 Eq. Ac. gálico (equivalentes de ácido gálico) a 408.6 Eq. Ac. gálico, y vitamina C la cual varió desde 0.13 mg/g a 6.85mg/g. Las frutas incluidas en el estudio fueron: la cereza, el banano morado, anona, guanaba, pitaya, mamey, carambola, y tuna. Con esto se demostró que las frutas autóctonas de Guatemala representan una fuente rica en sustancias con propiedades antioxidantes (35).

En el año 2002 Pinetta, C. realizó un estudio en seis plantas comestibles utilizadas por la etnia Q'iché de Guatemala, determinando la capacidad antioxidante de estos vegetales tanto frescos como después de la cocción, y en el caldo de cocción, obteniendo la mayor concentración de antioxidantes en el vegetal fresco y en el caldo de cocción (38).

Lima en el año 2003 realizó la evaluación de ocho solventes en el proceso de extracción para la determinación de actividad antioxidante del quilete (*Solanum americanum*) y el mamey (*Mammea americana*), obteniendo que la extracción alcohólica (metanol y etanol) es la mejor para la cuantificación de antioxidantes provenientes de vegetales. A su vez para la fruta se obtuvo mejor recuperación al utilizar el etanol como solvente de extracción (39).

D. Sapotáceas y su importancia

1. Generalidades

La familia de las sapotáceas está constituida por frutos de origen tropical, distribuidas desde el sur de Estados Unidos, México, Centro América, las Indias Occidentales, hasta Paraguay, Chile y Uruguay. Las especies frutícolas de esta familia son: *Pouteria zapota* (zapote), *P. viridis* (injerto), *P. campechiana* (canizte), *Manika zapota* (chico o chicozapote) y *Chrysophyllum cainito* (caimito).

Existe información que indica hallazgos arqueológicos de semillas de las sapotáceas que datan del periodo de 7,000 a 1,800 antes de Cristo. Estas especies frutales fueron utilizadas por culturas mesoamericana en alimentación humana, como fuente de madera y como medicina. Además, de las semillas se extraían aceites para mejorar la apariencia del cabello, y en algunas regiones este aceite era utilizado para darle brillo al chocolate (10).

Actualmente esta familia tiene importancia económica ya que además de ser comestible, del árbol se puede obtener látex para elaboración de goma de

mascar y madera durable y pesada, y de la semilla se pueden extraer aceites para la elaboración de champúes (10).

La pulpa de las sapotáceas es rica en carbohidratos, proteínas, fibra y minerales. En la tabla 1 se observa la información nutricional del injerto (40, 41).

Tabla 1. Composición de alimentos INCAP, en 100 gr. de porción comestible de injerto (41).

Sustancia	Unidad	Contenido
Agua	Porcentaje	68.4
Energía	Kcal	110
Proteínas totales	G	1.6
Grasa Total	G	0.2
Carbohidratos	G	28.6
Cenizas	G	1.2
Calcio	Mg	23
Fósforo	Mg	28
Hierro	Mg	0.7
Tiamina	Mg	0.01
Riboflavina	Mg	0.03
Niacina	Mg	1.90
Vitamina C	Mg	43
Retinol	Eq mcg	8
Fracción comestible	Porcentaje	59

2. Cultivo de *Pouteria viridis* en Guatemala

En Guatemala el injerto (*Pouteria viridis*) se cultiva desde los 900 msnm hasta los 1900 msnm. Fructifica en los meses de febrero a junio y de septiembre a diciembre, dependiendo de la localidad (anexo 1) (9, 11).

Aunque comúnmente se le conoce como injerto, está es una errónea denominación, ya que se piensa que es obtenido al injertar zapote. Sin embargo, Azurdia y colaboradores establecieron que el zapote y el injeto corresponden a dos entidades genéticamente distintas (10, 11).

Este fruto se consume fresco, o en helados y licuados. Su utilización es menor que el zapote, debido a su distribución más restringida. En algunas localidades de Huehuetenango, la bebida sapuyul se elabora con semilla de injerto (10).

El injerto se encuentra distribuido en Guatemala en tres zonas de vida (anexo 2 y 3), las cuales son:

Bosque húmedo subtropical frío: Constituido por localidades de Alta Verapaz como San Juan Chamelco, San Pedro Carchá, Cobán, Santa Cruz, San Cristóbal y Tactic. Las altitudes varían entre 1281 a 1500 metros sobre el nivel del mar (msnm) (9, 11).

Bosque húmedo montano bajo subtropical: En el departamento de Huehuetenango se encuentra en San Rafael Petzal, San Idelfonso Ixtahuacán, San Pedro Necta y Aguacatán; en Chimaltenango se encuentra en San Martín Jilotepeque, Chimaltenango, San Andrés Itzapa, Parramos y San José Poaquil. En esta zona la altitud varía entre 1520 a 1850 msnm (9, 11)

Bosque húmedo subtropical templado: Encontrándose en el depto. de Jalapa en Mataquescuintla; en Santa Rosa se encuentra en San Rafael las Flores, La Joya en Nueva Santa Rosa, e Ixpaco; en Sacatepéquez localizado en San Antonio Aguas Calientes, Jocotenango, Antigua Guatemala, Ciudad Vieja y San Miguel Dueñas. La altitud varía entre 1150 a 1580 msnm (9, 11).

3. Variabilidad de *Pouteria viridis*:

Se sabe que la variabilidad de *Pouteria viridis* se basa en la altura (metros sobre el nivel del mar) a la cual se coseche. En regiones bajas se obtienen frutos grandes y jugosos cuya apariencia es de zapote. En zonas altas se dan frutos pequeños con mayor concentración de azúcares y epidermis lisa color naranja. La mayor variabilidad se da en los frutos cultivados en Alta Verapaz. Las variaciones más comunes se dan en Chimaltenango donde se observan frutos con epicarpio verde amarillento; en Parramos se dan frutos naranja fuerte, muy parecidos al zapote; y en Sacatepéquez se observan frutos amarillentos y más atractivos para consumirlos (9, 11).

4. Erosión génica de *Pouteria viridis*

En muchos departamentos de Guatemala el injerto no es valorado como fruto potencialmente explotable. En Alta Verapaz se dice que el injerto crece como una maleza, eliminando los árboles nuevos que crecen. Además la existente presión sobre el recurso suelo para la siembra de productos rentables como el café, ajo, y cardamomo hace que se pierdan los árboles de injerto utilizando así el suelo con otros fines. Lo más común es observar sembrados de algún otro producto rentable, también suelen ser ocupados por ganado, o para la vivienda (10).

Actualmente el injerto se encuentra afectado por este fenómeno y está desapareciendo rápidamente, ya que no tiene condiciones de mercado, existe desconocimiento de sus usos y el período para que alcance la fructificación es muy largo (9).

IV. JUSTIFICACIÓN

Los antioxidantes son compuestos encargados de inactivar a los radicales libres, evitando así daño celular. Existen antioxidantes endógenos, los cuales son producidos por el organismo, además están los antioxidantes exógenos que se ingieren en la dieta, encontrándose en frutas y verduras (2, 3).

Guatemala es un país con gran diversidad de frutas, el injerto (*Pouteria viridis*) es uno de ellos. Este fruto perteneciente a la familia de las sapotáceas, se cultiva en varias regiones de Guatemala. En las últimas décadas se ha disminuido el cultivo de injerto ya que ha sido desplazado por productos agrícolas comerciales (9 - 11).

Debido a que en Guatemala no se han realizado estudios bioquímicos de las variedades de injerto, en el presente estudio se plantea determinar la cantidad de sustancias con poder antioxidante en el injerto y así identificar si éste puede ser una fuente importante de antioxidantes para la dieta.

Estudios realizados por Martínez demuestran que la pulpa de las sapotáceas es rica en carbohidratos, proteínas, fibra y minerales. Azurdia y Martínez indican que existe gran variabilidad en características físicas y organolépticas de los frutos de injerto cultivados en las distintas regiones de Guatemala. Con esto último se espera que el contenido de sustancias con propiedades antioxidantes varíe para cada región, identificando así la región en la cual se cosecha los frutos con mayor contenido de tales sustancias. Esta información puede ser utilizada para el mejoramiento del fruto de manera que pueda representar un fruto potencialmente explotable (9 - 11).

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Determinar las propiedades antioxidantes de variedades de injerto (*Pouteria viridis*) que se cultivan en tres regiones de Guatemala.

B. Objetivos Específicos

1. Determinar por el método de DPPH la capacidad antioxidante total de injertos cultivados en tres regiones de Guatemala.
2. Determinar a través del método de Folin-Ciocalteu la concentración de fenoles totales presente en injertos cultivados en tres regiones de Guatemala.
3. Determinar mediante HPLC la concentración de vitamina C presente en injertos cultivados en tres regiones de Guatemala.
4. Identificar la región en la cual se cosechan los frutos de injerto con mayor cantidad de sustancias con poder antioxidante.

VI. HIPÓTESIS

Los frutos de injerto cultivados en tres diferentes regiones de Guatemala presentan diferencia significativa en los contenidos de sustancias con propiedades antioxidantes.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de trabajo:

Todos los árboles de injerto que existen en Guatemala.

B. Muestra:

Se constituye por sesenta frutos de injerto obtenidos de la siguiente manera: dos árboles escogidos al azar en las zonas de vida mencionadas a continuación:

- Bosque húmedo subtropical frío: En el departamento de Alta Verapaz en los municipios de Cobán y San Juan Chamelco.
- Bosque húmedo montano bajo subtropical: En el departamento de Chimaltenango, municipios de San Andrés Itzapa y Chimaltenango.
- Bosque húmedo subtropical templado: Antigua Guatemala en Sacatepéquez y Nueva Santa Rosa en Santa Rosa.

C. Materiales

1. Recursos humanos:

Tesista: Br. Ana Lucía Pineda Villeda

Asesor: PhD. Rubén Velásquez Miranda

Asesora: MA. Julieta Salazar de Ariza

2. Equipo de laboratorio:

- Vortex
- Termómetro (sensibilidad 1°C)
- Agitadores magnéticos
- Desecadora
- Gradillas

- Balanza analítica (sensibilidad 0.0001 g)
- Balanza semianalítica (sensibilidad 0.001 g)
- Espectrofotómetro 210 marca Milton Roy UV-visible
- Potenciómetro
- Horno (90 – 100 °C)
- Refrigeradora (2 – 8 °C)
- Congelador (-20 °C)
- Baño María (90 – 100 °C)
- Cromatógrafo para HPLC (Cromatógrafo con detector Uv marca Merck Hitachi L-7400 La Chrom, bomba Merck Hitachi L-6200 A intelligent pump, cromatointegrador Merck Hitachi D-2500).

3. Reactivos:

a) Extracción

- Etanol al 95 por ciento grado industrial
- Nitrógeno gaseoso

b) Medición de la actividad antioxidante

- Reactivo α,α -difeníl- β -picrilhidrazilo DPPH grado reactivo
- Metanol absoluto grado reactivo
- Hidróxido de sodio 1.0 M disuelto en agua
- Acetato de sodio anhidro grado reactivo
- Ácido acético glacial grado reactivo
- Agua destilada

c) Medición de fenoles totales

- Reactivo de Folin Ciocalteu grado reactivo
- Carbonato de sodio grado reactivo
- Estándar de ácido gálico grado USP
- Agua destilada

d) Medición de vitamina C

- Agua grado HPLC
- Metanol absoluto grado HPLC
- Buffer de fosfatos 1M pH3
- Estándar de ácido ascórbico grado USP
- Acetona absoluta grado reactivo

4. Cristalería

- Erlenmeyer (25, 50, 250 y 500ml)
- Erlenmeyer con boca esmerilada (250ml)
- Mortero con pistilo (capacidad de 200 ml)
- Varilla de vidrio
- Embudos de vidrio
- Ampollas de decantación (capacidad de 250ml)
- Vidrios de reloj pyrex
- Botellas ámbar (capacidad de 200 ml)
- Beakers (50,100 y 500 ml)
- Probetas (25, 50, 100 y 1000 ml)
- Pipetas volumétricas (1,2,5 y 10 ml)
- Micropipetas marca Stanbio (20-40, 40 – 200 y 200 – 1000 μ L)
- Balones aforados (10, 25,50,100,250, y 1000 ml)

5. Otros

- Membranas de nylon 0.20 μ m
- Membranas de nylon 45 μ m
- Papel filtro
- Micropipeteador
- Macropipeteador
- Papel mayordomo
- Magnetos

6. Recursos institucionales

Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala.

D. Métodos

1. Recolección y selección de la muestra

Se realizaron tres visitas a los lugares de muestreo para el monitoreo de la mejor época de cosecha y así se determinó el mejor momento de corte. En la época de cosecha los injertos fueron cortados cuando iniciaban su maduración, identificando ésta por la suavidad del fruto al aplicar presión moderada con los dedos.

Una vez cortados los injertos fueron colocados en una hielera previamente preparada con hielo en el fondo, para mantenerlos a una temperatura aproximada de 10 °C, se trasladaran al laboratorio de Bioquímica en donde se colocaron a temperatura ambiente por uno o dos días para asegurar la maduración completa. Cuando el fruto completó su maduración se procedió con la preparación de extractos y obtención del peso seco.

2. Preparación de extractos (34)

a) Muestra Fresca

- Fueron pesados 20 g de la pulpa fresca madura, homogenizados en mortero con 25 ml de etanol al 95 por ciento y el homogenizado fue vertido en

erlenmeyer con boca esmerilada con capacidad de 250 ml, el cual debió forrarse con papel aluminio asegurando que no entrara luz a la muestra.

- Inmediatamente fue saturada la atmósfera con nitrógeno gaseoso por 30 segundos.
- Se colocó en agitación por dos horas utilizando agitador magnético, y protegido de la luz.
- Se filtró el extracto utilizando papel filtro y embudo. La solución fue recogida en botes ámbar de 200 ml, identificándolos correctamente. Fue saturada la atmósfera con nitrógeno gaseoso por 30 segundos.
- La pulpa que quedó del filtrado fue colocado de nuevo en el erlenmeyer. Se agregó 25 ml de etanol al
- 95 por ciento grado industrial, luego se saturó con nitrógeno gaseoso se colocó en agitación durante 1 hora. Este procedimiento fue repetido hasta que la pulpa del fruto quedó incolora. Todas las alícuotas fueron recogidas en el mismo frasco ámbar.
- Los extractos colocados en los frascos ámbar se saturaron con nitrógeno gaseoso cada vez que se utilizaron y se refrigeraron de 2 - 8 °C.
- Fue medido el volumen final de cada extracto.

b) Obtención del peso seco

- Se colocó un vidrio de reloj adecuadamente identificado en el horno a una temperatura de 90 – 100 °C, al transcurrir una hora fue sacado del horno y colocado en desecadora por 15 minutos, para que alcanzara la temperatura ambiente. El vidrio de reloj fue pesado y fue repetido el procedimiento hasta que el peso del vidrio de reloj fue constante (tara).
- Se agregó 1.000 gr de la pulpa del fruto, en el vidrio de reloj previamente tarado. Fue colocado en horno de 90 - 100°C por una hora, luego de 15 minutos en desecadora fue pesado. Se repitió el procedimiento hasta que se obtuvo un peso constante.

3. Determinación de la actividad antioxidante total (34)

a) Preparación de reactivos

DPPH

La proporción en la cual se trabajó la solución es de 2.19 mg del reactivo de DPPH por cada 10 ml de metanol absoluto grado reactivo. El reactivo se preparó el día de su utilización y se mantuvo aislado de la luz cubriendo el recipiente con papel aluminio o con nylon negro.

Buffer de acetatos pH 6

- Se disolvió 2.72 g de acetato de sodio anhidro en 100 ml de agua destilada.
- Se agregó 2.4 ml de ácido acético a 47.5 ml de la solución de acetato de sodio.
- Se ajustó la solución a un pH 6.0 con una solución de NaOH. (Se disolvió 24gr de NaOH en 100 ml de agua destilada)

b) Medición de la actividad antioxidante

Se realizó una prueba preliminar de la actividad antioxidante total de los extractos puros. Para ello se preparó un blanco, el tubo control, el blanco de muestra y una muestra (tabla 2). Fue incubado a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad. Se leyó la absorbancia del extracto a 517 nm y se calculó el porcentaje de disminución de la absorbancia causada por el extracto. Con este resultado se establecieron las diluciones de trabajo.

Se rotularon los tubos de ensayo y se midieron las cantidades que se indican a continuación:

Tabla 2. Prueba preliminar de medición de actividad antioxidante

	Solución tampón de acetato	Metanol	Solución de DPPH	Extracto de la fruta
Blanco	1 ml	2 ml	-----	-----
Control	1 ml	1.5 ml	0.5 ml	-----
Blanco de la Muestra	1 ml	1.9 ml	-----	0.1 ml
Muestra	1 ml	1.4 ml	0.5 ml	0.1 ml

Para cada muestra se realizó un blanco de muestra, y se trabajaron las muestras por duplicado. Se repitió el ensayo con diluciones de extracto de 1:5, 2:5, 3:5 y 4:5. Las diluciones se realizaron con metanol absoluto grado reactivo.

Luego de haber medido las sustancias anteriormente descritas, se agitaron en vortex por 30 segundos. Fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min, protegiéndolas de la luz. Fue realizada la medición de absorbancia en espectrofotómetro a 517 nm contra el blanco respectivo.

Fue calculado el porcentaje de disminución de la absorbancia causado por el extracto como se indica a continuación:

$$\% \text{ Disminución} = \frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control}}$$

Nota: A la absorbancia del control se restó la absorbancia del blanco, así como a las muestras se les restó la absorbancia del blanco de muestra. Los valores así obtenidos se colocan en la fórmula.

Se elaboró una gráfica con la concentración del extracto en el eje X y la disminución de la absorbancia en el eje Y. Se interpoló la concentración de inhibición al 50 por ciento (IC_{50}).

4. Determinación de fenoles totales (34)

a) Preparación de reactivos:

Solución madre de ácido gálico

Para la curva patrón se preparó la solución A, con 1mg de ácido gálico disuelto en 1 ml de agua destilada. Realizar una dilución 1:10 de la solución A, está fue la solución B con la cual se trabajó la curva de estándares (tabla 3).

Solución de carbonato de sodio

Fue preparada una solución de carbonato de sodio 0.010 % p/v (se pesó 10 mg de carbonato de sodio y se diluyó con 90 ml de agua destilada).

b) Determinación

Se prepararon las muestras según la siguiente tabla:

Tabla 3. Determinación de fenoles totales

	Reactivo de Folin	Na ₂ CO ₃ 0.11%	Agua destilada	Muestra o estándar
Blanco	0.4 ml	0.8 ml	4.0 ml	00.00
Estándar 1	0.4 ml	0.8 ml	3.975 ml	0.025 (ml de sol B)
Estándar 2	0.4 ml	0.8 ml	3.950 ml	0.050(ml de sol B)
Estándar 3	0.4 ml	0.8 ml	3.900 ml	0.100(ml de sol B)
Estándar 4	0.4 ml	0.8 ml	3.850 ml	0.150(ml de sol B)
Estándar 5	0.4 ml	0.8 ml	3.800 ml	0.200(ml de sol B)
Estándar 6	0.4 ml	0.8 ml	3.750 ml	0.250(ml de sol B)
Muestra 1	0.4 ml	0.8 ml	3.95 ml	0.050 ml muestra
Muestra 2	0.4 ml	0.8 ml	3.90 ml	0.100 ml muestra

Después de haber realizado las mediciones de las sustancias anteriormente descritas, los tubos se mezclaron en vortex y se colocaron en incubación de 90 a 100 °C durante 1 minuto.

Se esperó que alcanzara la temperatura ambiente y fue realizada la lectura de absorbancia a 765 nm. Usando la curva patrón se calculó la concentración de compuestos fenólicos según la ecuación de la recta obtenida con los estándares. Se calculó la concentración de compuestos fenólicos expresados como equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco.

5. Determinación de vitamina C (35)

a) Preparación de reactivos:

- Fase móvil: buffer de fosfatos 1M pH 3 y metanol grado HPLC (95:5).
- Para realizar el buffer de fosfato se pesó 1.5634 g de H_2NaPO_4 monohidratado y se disolvió en un litro de agua desionizada. Luego se ajustó a pH 3 con ácido clorhídrico 1M.
- Todos los reactivos y muestras se filtraron antes de la inyección, utilizando una membrana de nylon de 20 μm para las muestras y de 45 μm para las soluciones de la fase móvil.

b) Determinación:

- Se filtró la muestra antes de su inyección.
- Se realizó el análisis cromatográfico (HPLC) con las siguientes condiciones:

Columna: Lichrospher 100 μm de partícula y 5 μm de porosidad, C18 (octadecil silica gel) longitud 250mm por 4mm diámetro interno

Solvente: buffer de fosfatos: metanol (95:5)

Flujo: 1.0 ml por minuto

Volumen de inyección: 20 μl .

Tiempo de corrida: 10 minutos.

Detección: ultravioleta visible 265 nm

- Se inyectaron estándares de ácido ascórbico para obtener la curva patrón.
- Se inyectó el extracto de la muestra por duplicado.
- Se obtuvieron los resultados expresados en áreas bajo la curva, los cuales se colocaron en la ecuación de la curva patrón, calculando así la concentración de la muestra.

E. Diseño de la investigación

1. Diseño experimental

Tratamientos: Tres regiones las cuales corresponden

- Bosque húmedo subtropical frío.
- Bosque húmedo montano bajo subtropical.
- Bosque húmedo subtropical templado.

Replicas por tratamiento: De cada región se escogieron dos árboles al azar. De cada árbol se tomaron 10 muestras de injerto.

El diseño utilizado es Diseño Anidado en dos etapas. Donde la primera etapa son las zonas de vida y la segunda etapa son los árboles a muestrear.

El número de muestra se calculó de la siguiente manera:

$$n_j = 2 \frac{N_c^2 \sigma}{\Delta^2}$$

En donde

$$N_c = Z_{1-\alpha/2} = 2.38$$

$$\Delta = \sigma$$

$$N_j = 2N_c^2 = 20.76 = 21$$

Por conveniencia se analizarán como mínimo diez muestras de cada árbol.

2. Análisis de datos

Los resultados fueron tabulados y se expresaron de la siguiente forma:

Capacidad Antioxidante Total: Expresada en IC_{50} . Concentración de inhibición al 50 por ciento expresada en miligramos de fruta.

Fenoles totales: Equivalentes de ácido gálico por gramo de fruta (peso seco).

Vitamina C: En miligramos de vitamina C por gramo de fruta (peso seco).

De cada variable se realizó un análisis de varianza para un diseño anidado en dos etapas.

Cuando el análisis de varianza indicó que había diferencia significativa, la comparación de los valores de sustancias antioxidantes se llevó a cabo por la Prueba de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) comparando las regiones por pares.

VIII. RESULTADOS

Los frutos de injerto colectados en las diferentes zonas de vida presentaron diferencias marcadas en su apariencia, esto se debió principalmente al genotipo de la fruta, ya que se ha demostrado alta variabilidad genética del injerto (anexo 4 y 5).

La tabla 1 muestra los resultados de la actividad antioxidante total, fenoles totales y vitamina C obtenidos de las muestras de injerto cultivados en tres zonas de vida y en las dos localidades que componen cada una de las zonas de vida muestreadas; en la misma se observa el promedio, la desviación estándar, valor máximo y valor mínimo de cada parámetro.

En la tabla 2 se presentan los promedios y rangos de los anteriores valores para los frutos de cada una de las regiones; se observa que los frutos del bosque húmedo subtropical templado presentan los valores más altos de: actividad antioxidante (IC_{50} de 10.88 ± 1.95 mg), fenoles totales (equivalentes de ácido gálico/g de 6.23 ± 0.70) y vitamina C (mg de ácido ascórbico/g de 1.03 ± 0.089).

Los valores de cada parámetro fueron analizados mediante la prueba de diferencia mínima de Fisher para un análisis anidado en dos etapas; este análisis compara los valores de dos medias obteniendo la magnitud que cada etapa aporta a la variación. En el presente estudio la primera etapa correspondía a las zonas de vida, la cual aportó la mayor variación y la segunda etapa correspondía a las localidades. La prueba de Fisher indicó que el lugar de cultivo del injerto influye en el contenido de sustancias antioxidantes en los frutos, también juegan un papel importante las diferentes variedades notables durante la colecta; los valores de p para la comparación de cada par de medias se muestran en la tabla 3. Para realizar el análisis gráfico se utilizó el test de Tukey, en donde se observa la diferencia en los contenidos de sustancias antioxidantes entre las dos localidades que componen

cada una de las regiones. Las gráficas del test de Tukey se muestran en el anexo 6, gráficas de la 1 a la 12,.

A. Actividad antioxidante total

En la tabla 1 se observa que la mayor actividad antioxidante se encontró en los injertos cultivados en Nueva Santa Rosa, seguido de los injertos de Antigua Guatemala y Chimaltenango. Los injertos cultivados en San Andrés Itzapa corresponden a los que poseen la menor actividad antioxidante total. La gráfica 1 compara los valores de IC₅₀ obtenidos de injertos cultivados en las tres zonas de vida analizadas, se observa que existe marcada diferencia entre los frutos de las tres regiones, siendo los frutos del bosque húmedo subtropical templado (Nueva Santa Rosa y Antigua Guatemala) los que presentan los valores más altos de actividad antioxidante total y menores intervalos de confianza, con un IC₅₀ de 7.99 mg y 12.88 mg respectivamente.

Las gráficas 2 a 4 comparan las localidades que componen cada uno de los bosques (anexo 6). En la gráfica 3 se comparan los antioxidantes de los frutos de las localidades del bosque húmedo subtropical templado (Nueva Santa Rosa y Antigua Guatemala) y en la gráfica 4, los del bosque húmedo montano bajo subtropical (Itzapa y Chimaltenango). Los frutos del bosque húmedo subtropical frío no presentaron diferencia entre sus regiones (anexo 6).

B. Fenoles totales

El mayor contenido de fenoles totales lo presentaron los injertos cultivados en Cobán (tabla 1). La comparación en el contenido de fenoles totales presentes en injertos de las tres zonas de vida analizadas se muestra en la gráfica 5 (anexo6), en ella se observa que existe diferencia significativa entre los frutos de los tres bosques, siendo el bosque húmedo subtropical templado (Nueva Santa Rosa y

Antigua Guatemala) el que presenta los valores promedio más altos de fenoles totales.

En las gráficas 6 a 8 se observa la diferencia en la concentración de fenoles totales en injertos procedentes de las zonas de vida, siendo los frutos del bosque húmedo subtropical frío (San Juan Chamelco y Cobán) los únicos que posee diferencia gráfica entre sus localidades según lo observado en la gráfica 6 (anexo 6).

C. Vitamina C

Según la tabla 1 el mayor contenido de vitamina C se encuentra en los injertos cultivados en Antigua Guatemala.

El test de tukey para el contenido de vitamina C en injertos se encuentra en la gráfica 9 (anexo 6), en ella se observa que la concentración de vitamina C es diferente para las tres regiones analizadas, además las tres zonas de vida son diferentes en cuanto al contenido de vitamina C presente en los frutos de cada una de las localidades, es decir existe diferencia tanto entre las tres zonas de vida y entre las localidades que las componen (gráficas 10 a 12 del anexo 6). El mayor contenido de vitamina C fue encontrado en los frutos cultivados en el bosque húmedo subtropical templado (Nueva Santa Rosa y Antigua Guatemala).

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se determinó la actividad antioxidante total, el contenido de fenoles totales y vitamina C presentes en los frutos de injerto (*Pouteria viridis*) cosechados en tres zonas de vida de Guatemala donde es común encontrarlos (anexo 3).

Los injertos se obtuvieron de: Cobán y San Juan Chamelco (zona de vida bosque húmedo subtropical frío), Chimaltenango y San Andrés Itzapa, (bosque húmedo montano bajo subtropical), y Antigua Guatemala y Nueva Santa Rosa, (bosque húmedo subtropical templado); en los frutos de injerto colectados se notó diferencias marcadas en el aspecto: el color de la cáscara varió desde verde hasta naranja intenso; el color de la pulpa fue de amarillo a naranja intenso, y la forma varió desde frutos ovalados a frutos en forma de trompo (anexo 5).

Las determinaciones llevadas a cabo en esta investigación son confiables ya que los métodos utilizados para la medición de sustancias antioxidantes se encuentran estandarizados en el departamento de Bioquímica en la Escuela de Química Biológica, en donde se realizó este estudio. En la presente investigación se utilizó etanol al 95 por ciento para la extracción, ya que Lima en el 2003 demostró que el etanol es más eficiente que el metanol y las soluciones tampón de fosfatos para la extracción de sustancias antioxidantes en frutas (39).

Los frutos de injerto del bosque húmedo subtropical templado (localidades de Nueva Santa Rosa y Antigua Guatemala) son los que presentan un mayor contenido de actividad antioxidante según los tres parámetros medidos. Los frutos de injerto con menor contenido de actividad antioxidante fue el bosque húmedo subtropical frío (localidades de San Juan Chamelco y Cobán). Todos los frutos de injerto analizadas presentaron diferencias para los tres parámetros de actividad antioxidante que fueron medidos; además, los frutos provenientes de las dos localidades de cada zona de vida, muestran diferencias en por lo menos uno de los

parámetros medidos. La zona de vida cuyas localidades mostraron las mayores diferencias entre sí fue el bosque húmedo montano bajo subtropical (localidades de Itzapa y Chimaltenango).

Los intervalos con nivel de confianza de 95 % corresponden a: actividad antioxidante total 31.86 a 45.82 mg de materia vegetal fresca, fenoles totales 5.30 a 5.96 Eq de Ac gálico/g materia fresca y vitamina C 0.79 a 0.91 mg/g materia fresca

La actividad antioxidante total se expresó como IC_{50} , esta dimensional tiene una relación inversa con la actividad antioxidante total, es decir, un valor menor de IC_{50} representa mayor poder antioxidante. El menor valor de IC_{50} lo exhibieron los frutos de Nueva Santa Rosa con 7.99 mg de materia vegetal fresca, y el mayor lo exhibieron los frutos de Itzapa con 67.01 mg de materia fresca. Los frutos cultivados en las tres zonas de vida poseen diferencia significativa para la actividad antioxidante total, también existe diferencia entre localidades en los injertos obtenidos del bosque húmedo montano bajo subtropical y del bosque húmedo subtropical templado.

El contenido de fenoles totales varió entre 3.33 Eq de Ac gálico/g materia fresca en injertos de San Juan Chamelco hasta 6.94 Eq de Ac gálico/g materia fresca en injertos de Cobán. Presentaron diferencias significativas los injertos de las tres zonas de vida y entre las localidades del bosque húmedo subtropical frío (San Juan Chamelco y Cobán). Los injertos cultivados en el bosque húmedo subtropical templado presentan cerca de 18 por ciento más fenoles que los cultivados en el bosque húmedo subtropical frío y un 11 por ciento más que los cultivados en el bosque húmedo montano bajo subtropical. Los frutos de Cobán poseen el doble de fenoles totales que los frutos de San Juan Chamelco.

En la concentración de vitamina C los valores se encuentran entre 1.14 mg/g materia fresca para los injertos de Antigua Guatemala, y 0.52 mg/g materia fresca en injertos procedentes de San Juan Chamelco. Se observó diferencia significativa

entre injertos procedentes de las tres zonas de vida y entre las localidades que componen cada una de las mismas.

Las propiedades antioxidantes de un vegetal pueden estar influenciadas por factores como variabilidad genética y factores ambientales. El injerto es un fruto que posee gran variabilidad genética, en un estudio realizado por Nufio en el año 2001, se demostró que en un mismo sitio de recolección de muestras de injerto se obtuvieron genotipos² diferentes, de las veinte muestras incluidas en el estudio todas corresponden a un genotipo distinto, sin embargo en este estudio no se tomaron en cuenta características físicas para realizar la clasificación de los genotipos. Por lo anterior se puede considerar que cada una de los diferentes fenotipos encontrados pueden representar a un genotipo distinto, esto puede ser una de las fuentes de variación en el contenido de sustancias antioxidantes (anexo 4 y 5) (44).

Además de la variación por el genotipo diversidad de factores como la cantidad de luz, tipo de suelo, clima y contaminación ambiental pueden afectar el contenido de las sustancias antioxidantes. Los datos de cantidad de luz solar y tipo de suelo reportados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) en los distintos puntos muestreados no presentan grandes diferencias debido a que las escalas utilizadas son muy gruesas y no permiten notar un cambio marcado (anexo 3). Según el estudio realizado por Smirnoff en el 2002, los antioxidantes de una planta aumentan al incrementar el tiempo de exposición solar, ya que se producen compuestos que cumplen con la función de protección del fruto a la luz ultravioleta, de igual forma las plantas pueden producir antioxidantes para protegerse de los radicales libres formados por la contaminación ambiental (43).

Aparte de los factores ya mencionados, otros estudios han demostrado que el grado de madurez de los frutos interviene en la cantidad de sustancias

² El concepto de genotipo se da en base a la comparación de seis enzimas polimórficas presentes en el injerto.

antioxidantes presentes. En este estudio los frutos se colectaron cuando iniciaban su maduración, ya que esta etapa es la adecuada para el corte, al trasladarlos al laboratorio se esperó que alcanzaran el nivel de maduración adecuado para el consumo, sin embargo no todos los frutos tuvieron el mismo nivel de maduración, esto último se cree que fue uno de los motivos que influyó la variación de las propiedades antioxidantes.

A pesar de las diferencias encontradas, los frutos de injerto representan una fuente alternativa de antioxidantes exógenos para el organismo. La cantidad de antioxidantes que se obtienen de un fruto del bosque húmedo subtropical templado también se obtienen con seis injertos cultivados en el bosque húmedo subtropical frío, y aproximadamente de cuatro injertos cultivados en el bosque húmedo montano bajo subtropical. En cuanto al contenido de vitamina C, cuya ingesta diaria recomendada es de 60 mg para un adulto, cuando se consume un injerto de peso promedio (aproximadamente 200 gr, 59% del fruto es fracción comestible), se cubre en un 224 por ciento la recomendación dietética diaria con los injertos cultivados en Antigua Guatemala y en un 100 por ciento con los injertos cultivados en San Juan Chamelco, siendo esta última región en donde se reporta la menor concentración de vitamina C en los injertos (9,31,45).

En el departamento de Bioquímica, lugar donde se realizó el presente investigación, se han realizado varios estudios de las propiedades antioxidantes de varios frutos, esto permite realizar la comparación de la capacidad antioxidante total en base seca del injerto con la de la uva negra con cáscara. Los injertos cultivados en Nueva Santa Rosa (IC₅₀ de 2.7 mg) poseen aproximadamente la mitad de actividad antioxidante total que la uva negra con cáscara (IC₅₀ de 1.1 mg) y aproximadamente el doble de la papaya y el zapote los cuales tienen un IC₅₀ de 5.73 mg y 6.94 mg respectivamente (34). Según los resultados de este estudio, el aporte de antioxidantes de un injerto producido en Nueva Santa Rosa es el mismo que el aportado por ocho frutos de Itzapa y ocho frutos de San Juan Chamelco. La concentración de fenoles presentes en el injerto no es comparable con frutos ricos en este tipo de compuestos, tal es el caso de la cereza y la anona (241.1 Eq de Ac

gálico/g materia seca y 408.6 Eq de Ac gálico/g materia seca), ya que el injerto posee valores que van desde 13.7 Eq de Ac gálico/g materia seca a 33.6 Eq de Ac gálico/g materia seca; sin embargo posee mayor contenido que el zapote (6.94 Eq de Ac gálico/g materia seca) el cual es un fruto que pertenece a la misma familia que el injerto (34, 35).

En general, este trabajo demostró las propiedades antioxidantes de los injertos producidos en tres zonas de vida de Guatemala, siendo los del bosque húmedo subtropical templado los que presentaron un mayor contenido de las tres sustancias medidas; específicamente la localidad de Nueva Santa Rosa resultó ser el área más promisorio. Con los resultados obtenidos se evidencia la importancia de conservar y promover la preservación y el consumo de este fruto, además de presentar un posible fruto de exportación por sus propiedades anteriormente expuestas.

X. CONCLUSIONES

- A. La capacidad antioxidante de los injertos estudiados se estimó en los siguientes intervalos con nivel de confianza del 95%: actividad antioxidante total 31.86 a 45.82 mg de materia vegetal fresca, fenoles totales 5.30 a 5.96 Eq de Ac gálico/g materia fresca y vitamina C 0.79 a 0.91 mg/g materia fresca.
- B. Los injertos cultivados en la región correspondiente al bosque húmedo subtropical templado (localidades de Nueva Santa Rosa y Antigua Guatemala) presentaron el mayor contenido de los parámetros medidos.
- C. Los injertos cultivados en el bosque húmedo subtropical frío (localidades de San Juan Chamelco y Cobán) presentaron el menor contenido de actividad antioxidante total, fenoles totales y vitamina C.
- D. Se observó que existe diferencia significativa en los tres parámetros medidos entre las tres zonas de vida estudiadas.
- E. Se observó diferencia entre los frutos cultivados en las localidades que componen cada una de las zonas de vida, por lo menos para uno de los parámetros medidos.
- F. El contenido de sustancias antioxidantes está influenciado por el lugar de cultivo de los frutos de injerto, así mismo como por el genotipo de las mismas.

XI. RECOMENDACIONES

- A. Caracterizar la variabilidad genética de los materiales vegetales incluidos en el presente estudio, para poder relacionarla con el contenido de sustancias antioxidantes.
- B. Realizar este tipo de estudio en otras frutas autóctonas de Guatemala en las que se haya demostrado alta variabilidad.
- C. Divulgar la información obtenida en este estudio para contribuir con el consumo, explotación y exportación del injerto.

XII. REFERENCIAS

1. Robbins S *et al.* Patología funcional y estructural. 5.ed. México: Mc Graw Hill Interamericana, 1995. XIV+1533p. (p. 4,13-14).
2. Murray RK *et al.* Bioquímica de Harper. 13.ed. México DF.: Manual Moderno, 1994. 961 p. (p. 179-180).
3. Desmarhelier C. Ciccía G. Antioxidantes de origen vegetal. Ciencias Hoy. 1998; 8: 3.
4. Del Castillo V. Radicales Libres y Ejercicio. Rev. Digit. Antiox. 2000; 23: 119-125.
5. Solórzano del Río H. Los antioxidantes nutricionales y el cáncer. México: Sociedad Médica de Investigaciones Enzimáticas. 2000.
6. John JH *et al.* Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomized controlled trial. Lancet 2002; 359: 322.
7. Gutiérrez Maydata BA. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. Acta Farm. Bonaer. 2002; 21(2): 149-152.
8. Prasad K *et al.* High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. J. Of Am. Coll. Of Nutr. 2000; 18: 1,13-25.
9. Martínez E. Riqueza génica de sapotáceas en Guatemala. Lecturas en Recursos Fitogenéticos. Instituto de Investigaciones Agronómicas. Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala. 135p. (92-97 p.)
10. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Sapotáceas en Mesoamérica. IPGRI-BID No. ATN/SF-4356-RG. 1997. 187p. (13,19,55 p.)
11. Azurdía C *et al.* Distribución, variabilidad y riesgo de erosión génica de injerto (*Pouteria viridis*) en Guatemala. Lecturas en Recursos Fitogenéticos. Instituto de Investigaciones Agronómicas. Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala. 135p. (102-108p.)
12. De la Cruz JR. Clasificación de zonas de vida de Guatemala a nivel de reconocimiento. Guatemala: INAFOR-DIGESA 1986. 41p.

13. Martínez Cayuela M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. España: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, polígono Universitario de Cartuja, Universidad de Granada. 1871p.
14. Rodríguez Perón JM *et al.* Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cub. Med Milit 2001; 30(1):15-20 Disponible en: www.infomed.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/milo8101.htm
15. Tiskow Drost G. Radicales libres en biología y medicina: una breve revisión. Rev. Cub. Med. Milit 1996; 2: 44-57.
16. Rapaport SI. Introducción a la Hematología. 2.ed. Fontan F trad. México: Salvat, 1993. XIV+625. (216-218p.)
17. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the fenton reaction. Toxicol Lett. 1995; 82: 969-974.
18. Fridovich I. Superoxide dismutases. Science 1975; 44:147-159.
19. Durán HA. Propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Argentina: Comisión nacional de energía atómica. Departamento de Radiobiología, 1999.
20. Moncada S y Higgs A. The l-arginine-nitric oxide pathway. N. Engl.J. Med. 1993; 329: 2002-2011.
21. Stephens C *et al.* Cambridge heart antioxidant study (CHAOS). Lancet 1996; 347: 781.
22. Carbonell F. Estrés oxidativo y riesgo cardiovascular. Boletín Secf. 2001; 4: 120.
23. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. J Biol Chem 1988; 263: 17205-17208
24. Céspedes Miranda EN *et al.* Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. Rev Cubana Invest Biomed 2001;15(2):96-104. Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol15_2_96/ibisu296.htm
25. Bendich A. Carotenoids and the immune response. J. Nutr. 1989;119(1):112-115.

26. Vasconcellos A. Alimentos funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. Departamento de Ciencias de Alimentos y Nutrición, Universidad Chapman, Orange, California, U.S.A.
27. Surai PF. Protección antioxidante en el intestino: un buen comienzo es la mitad de la batalla. Centro de Investigaciones de Ciencia Aviar, SAC, Auchincruive. Ayr, Scotland. Disponible en http://www.engormix.com/nuevo/prueba/alltech_notas.asp
28. Martínez-Flórez S *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. 2002; 17 (6): 271-278.
29. Hertog MG *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. Lancet, 1993; 342(878):1007-1011.
30. Masaki KH *et al.* Acción de las vitaminas E y C en la función cognoscitiva y la demencia en individuos ancianos. National Institute of Health, Bethesda. Neurology 2000; 54: 1265-72.
31. Sies H, Sthal W y Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins E and C, b-carotene and other carotenoids. In: Beyond deficiency: new views on the function and health benefits of vitamins. 1992
32. Parks DA, *et al* Cardiovascular protection by alcohol and polyphenols. University of Alabama at Birmingham, USA. Ann NY Acad Sci 2002;957:115-121
33. Liu L *et al.* Vitamin C preserves endothelial function in patients with coronary heart disease after a high-fat meal. Hunan University. Clin Cardiol 2002; 25: 219-224.
34. Caballeros K. Optimización de dos métodos para e tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala: (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 54. (19-20p.)
35. Barahona A *et al.* Determinación de la Actividad Antioxidante en Frutas Autóctonas Disponibles en los Principales Mercados de la Ciudad Capital de Guatemala. Rev Cient. USAC. IIQB. 2002; 15: 41-44.
36. Correa P *et al.* Antioxidant micronutrients and gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 1998;12(1):73-82.

37. So M *et al.* Poliphenols and diet. American Institute for Cancer Research. 1996.
38. Pinetta Magarin C. Capacidad antioxidante en algunas plantas comestibles autóctonas de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2002. 49p.
39. Lima Pimentel S. Evaluación de distintos solventes para el proceso de extracción en la determinación de la actividad antioxidante de quilete (*Solanum americanum*) y mamey (*Mammea americana*). Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003. 56p.
40. León J. Botánica de los cultivos tropicales. 3.ed. IICA. Costa Rica:2000 522p.
41. Heldl TM. Tabla de composición de alimentos de Centroamérica. 1.ed. Guatemala: OPS, INCAP, 1996.
42. Campos Oliva J. Contenido de macronutrientes, minerales y carotenos en plantas comestibles autóctonas de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003. 73p.
43. Smirnoff, N Antioxidants and Reactive Oxygen species in plants. Special Issue. Jour Exp Bot Vol 2002;53(372):1331-1341.
44. Nufío Reyes B. Determinación de la variabilidad genética en especies de *Pouteria* (Sapotácea) usando isoenzimas como marcadores genéticos. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Agronomía) 2001. 59p.
45. Torún B *et al.* Recomendaciones dietéticas diarias del INCAP. INCAP-OPS. Guatemala 1998. IV+137 p.
46. Programa de emergencia por desastres naturales (PEDN). Proyección de mapa digital, con base a zonas de vida a nivel de reconocimiento. Laboratorio de sistemas de información geográfica (SIG-SIGMA).
47. Programa de emergencia por desastres naturales (PEDN). Proyección de mapa digital, con base a mapa de Simmons C y otros, 1959. Laboratorio de sistemas de información geográfica (SIG-SIGMA).

XIII. ANEXOS

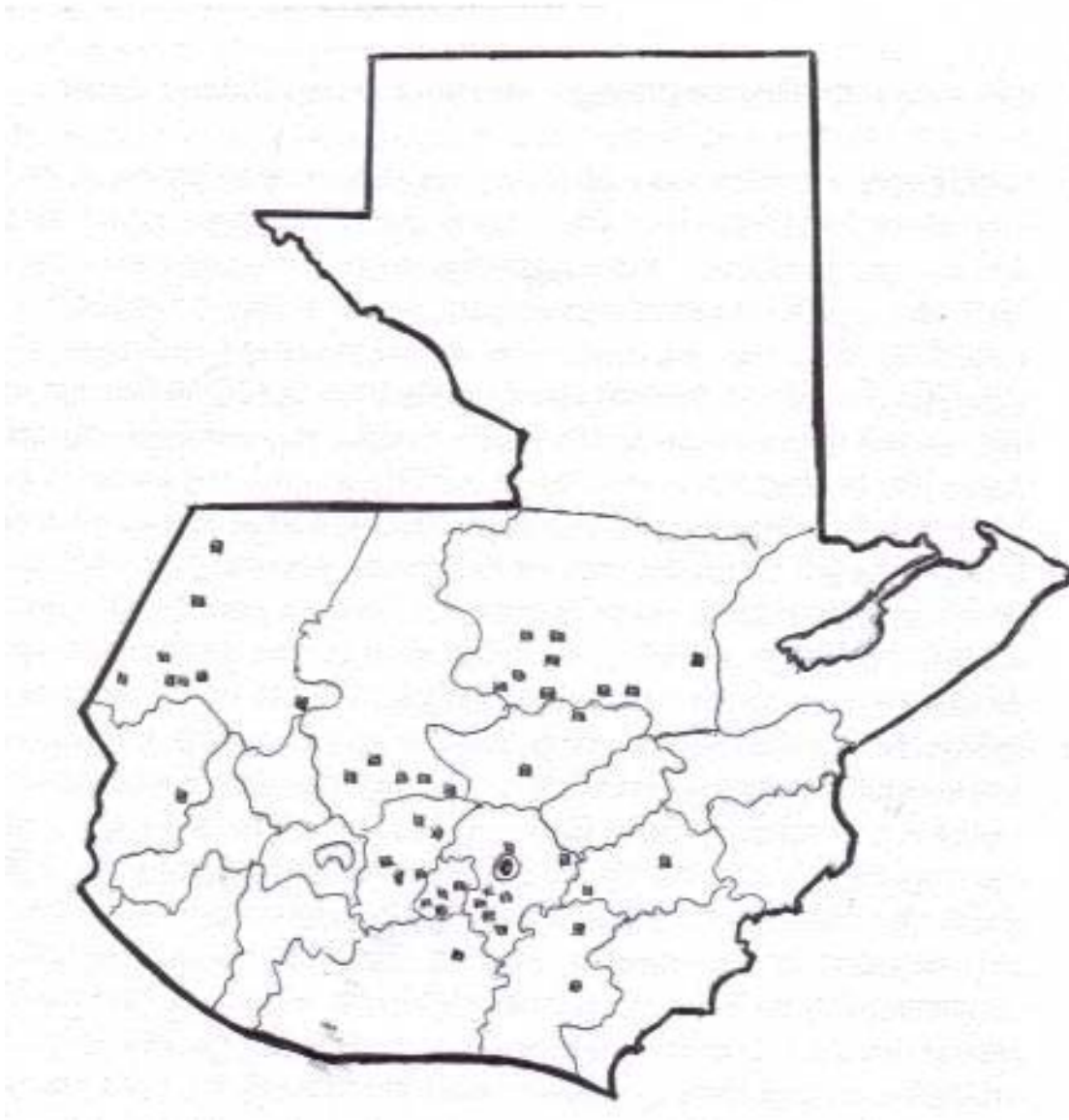
ANEXO 1

Época de fructificación del injerto en diferentes localidades de Guatemala

Lugar	Mes del año											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Panzos, Alta Verapaz												—
Xantacá, Carchá, Alta Verapaz					—	—						
San Juan Chamelco, Alta Verapaz					—	—						
Cobán, Alta Verapaz					—	—						
Amatitlán Guatemala									—	—		
Sn.Rafael Petzal, Huehuetenango					—	—						
Sn.Idelfonso Ixtahuacán, Huehuetenango					—	—						
San Pedro Necta Huehuetenango					—	—						
Mataquescuintla, Jalapa					—	—						
Nueva Santa Rosa, Santa Rosa											—	—
La Joya, Santa Rosa										—	—	
Ixpaco, Santa Rosa									—			
Moyuta, Jutiapa					—	—						
San Miguel Dueñas, Sacatepéquez					—	—						
Barcenas Villa Nueva, Guatemala								—	—			
Joyabaj, Quiche								—	—			
Sacapulas, Quiche										—	—	

Fuente: Azurdia, C. et al. Distribución variabilidad y riesgo de erosión genética de injerto (*Pouteria viridis*) en Guatemala.

ANEXO 2

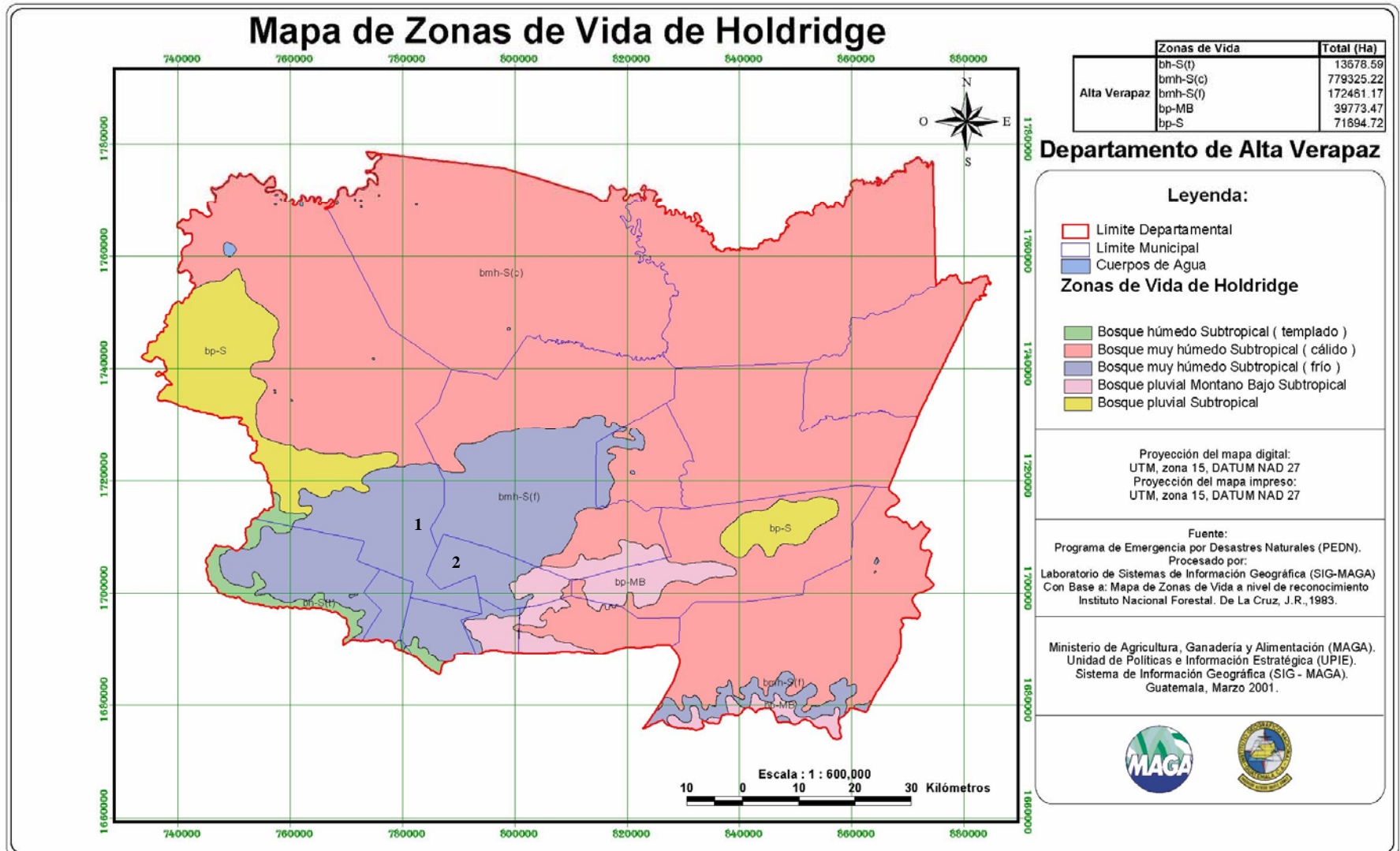


Distribución geográfica de *Pouteria viridis* en Guatemala. Fuente: Azurdia, C. et al. Distribución variabilidad y riesgo de erosión genética de injerto (*Pouteria viridis*) en Guatemala.

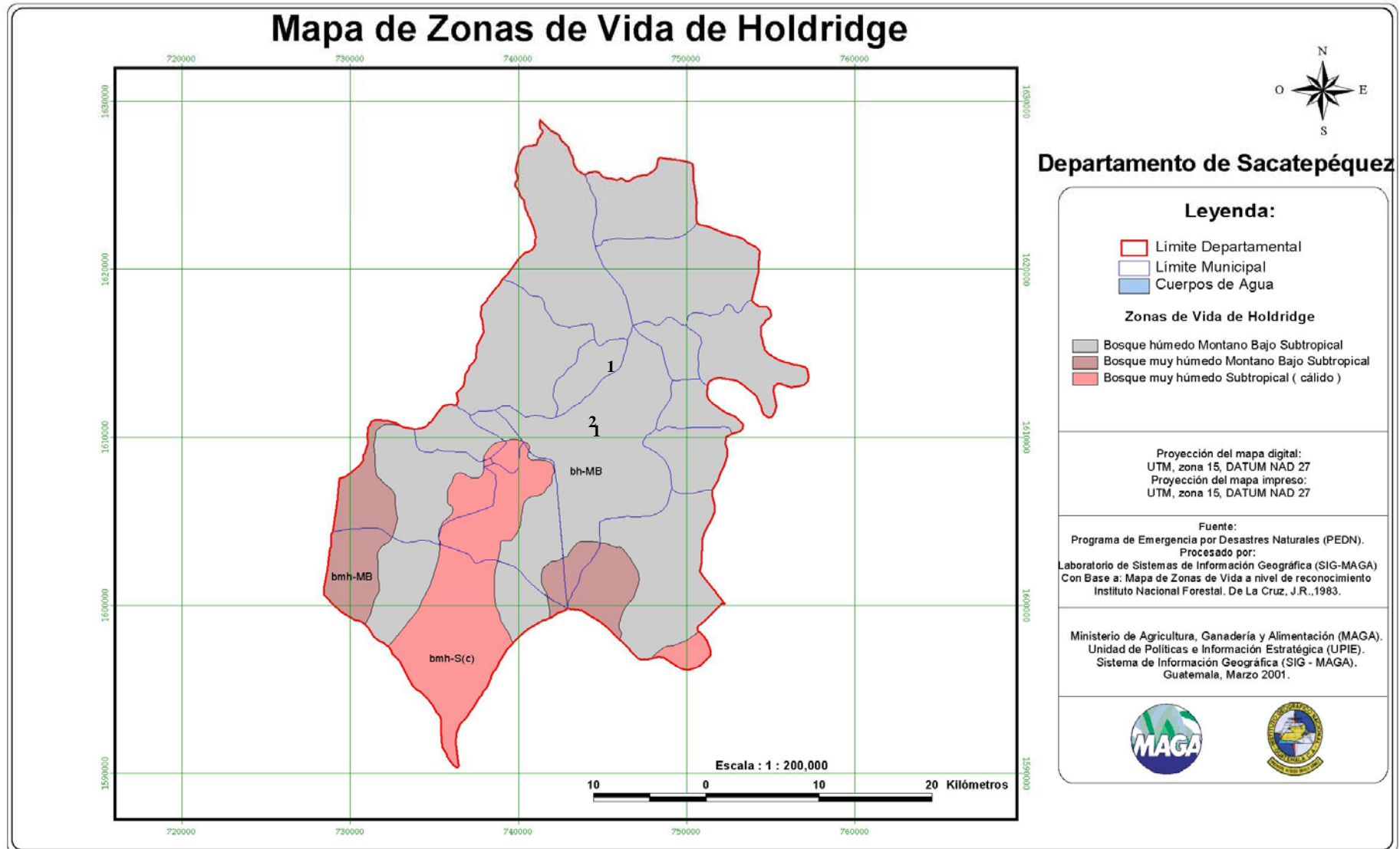
ANEXO 3 MAPAS

ANEXO 3.1 Zonas de Vida

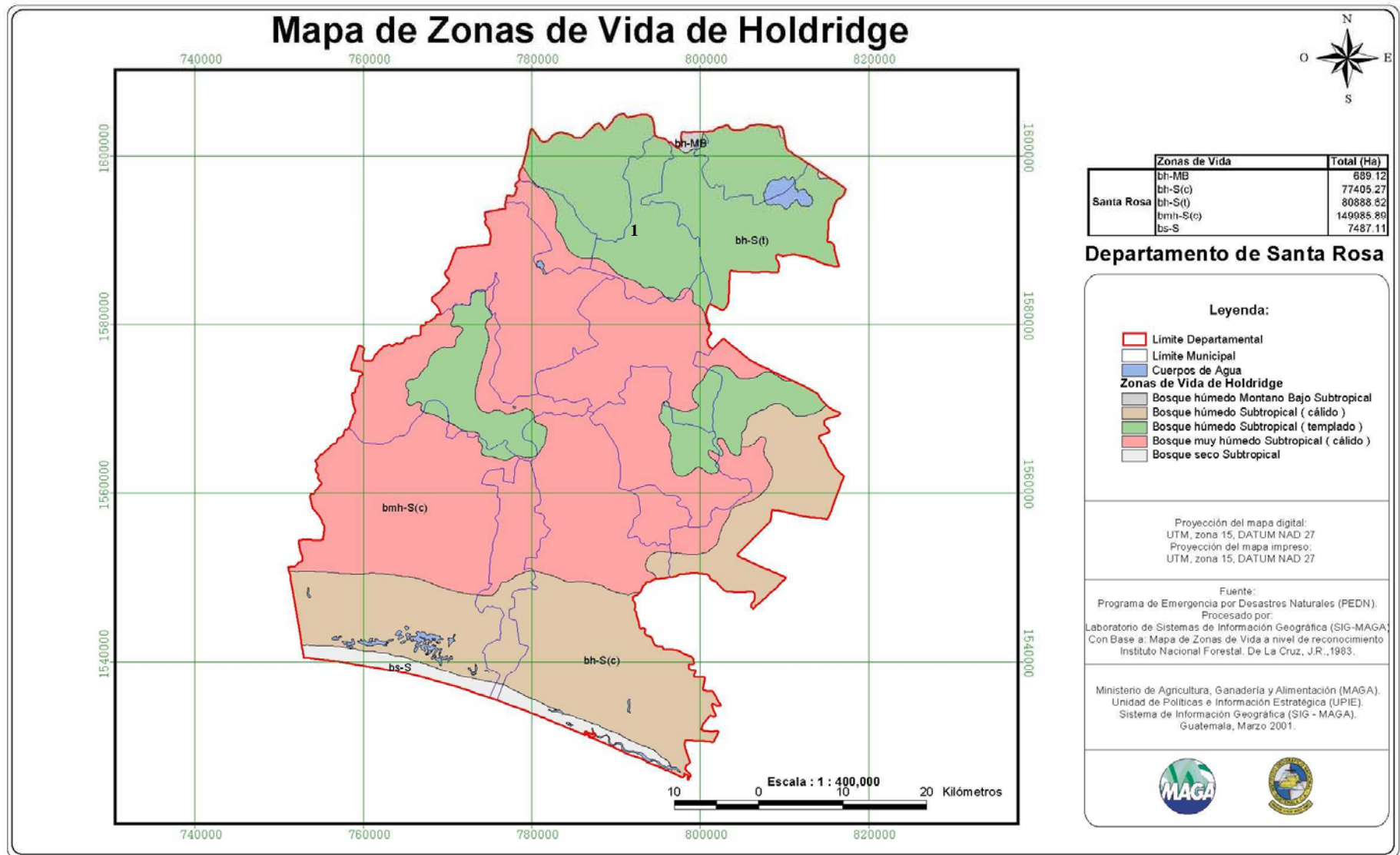
A. Zona de vida de Holdridge. Depto. de Alta Verapaz. 1 Cobán 2 San Juan Chamelco



B. Zonas de vida de Holdridge. Depto de Sacatepéquez. 1 Antigua Guatemala



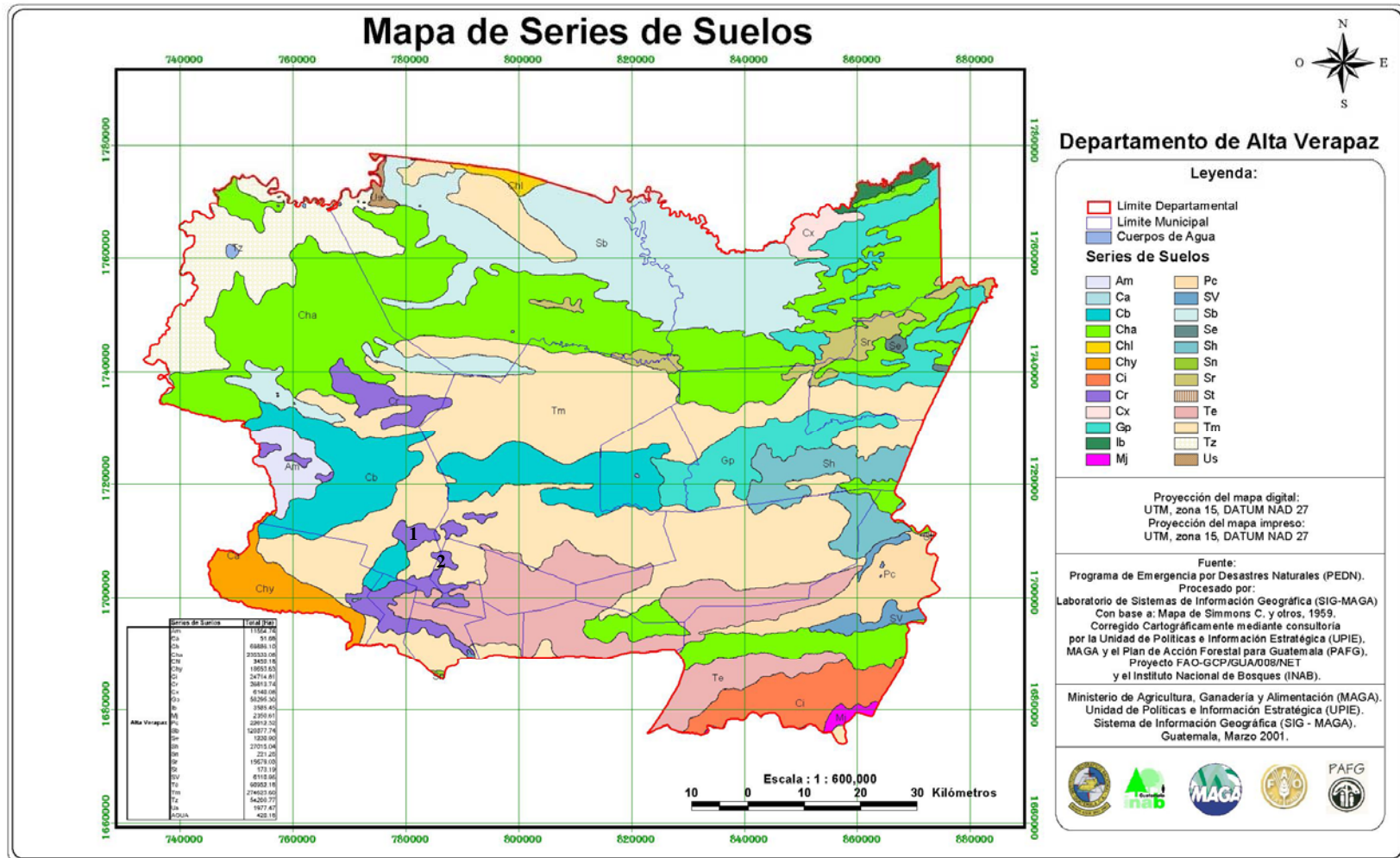
C. Zonas de vida de Holdridge. Depto de Santa Rosa. 1 Nueva Santa Rosa



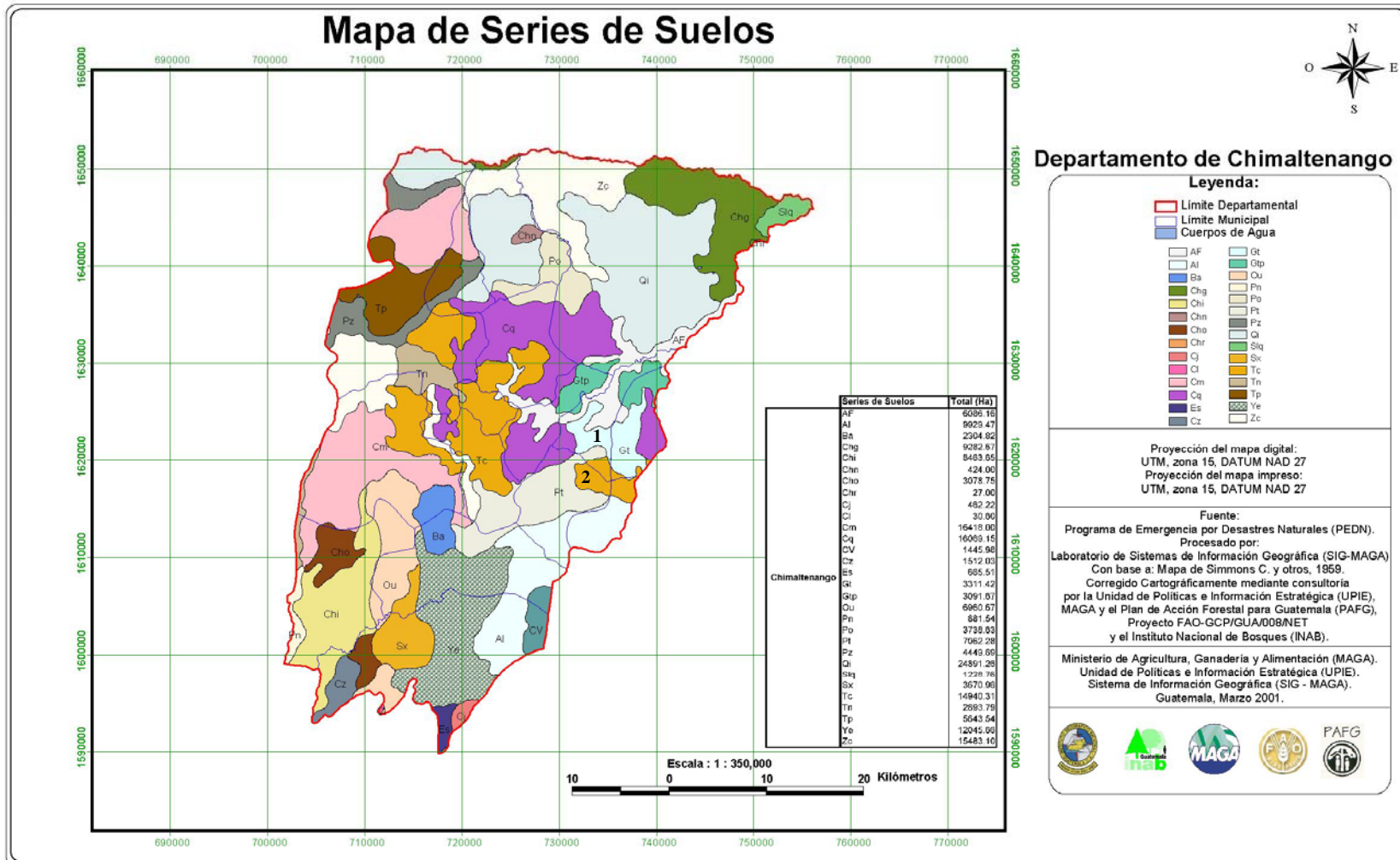
ANEXO 3.2

Mapa de suelos

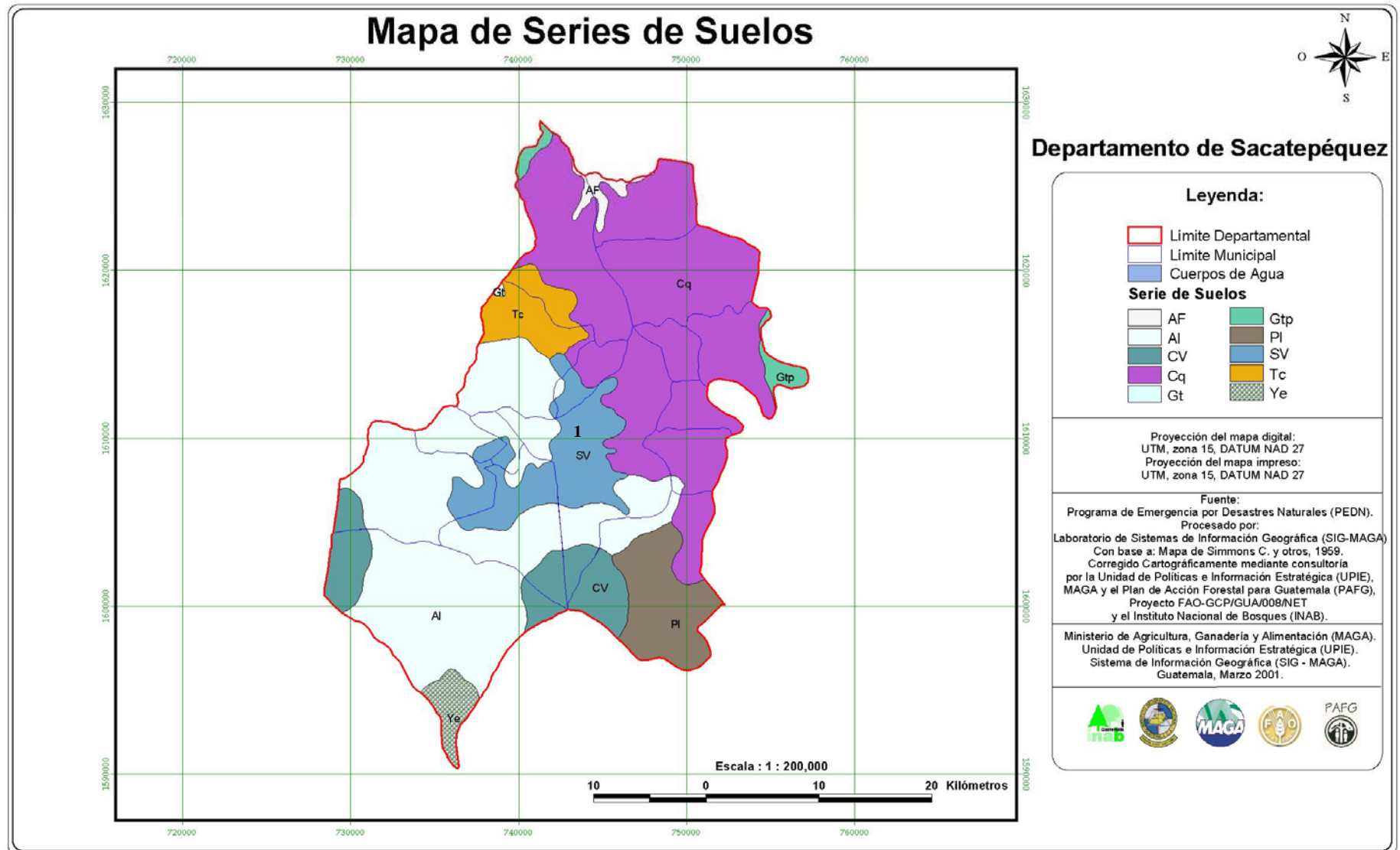
A. Mapa de Suelos Depto. de Alta Verapaz. 1 Cobán 2 San Juan Chamelco



B. Mapa de suelos Depto. de Chimaltenango. 1 Chimaltenango 2 Itzapa



C. Mapa de suelos Depto. de Sacatepéquez. 1 Antigua Guatemala

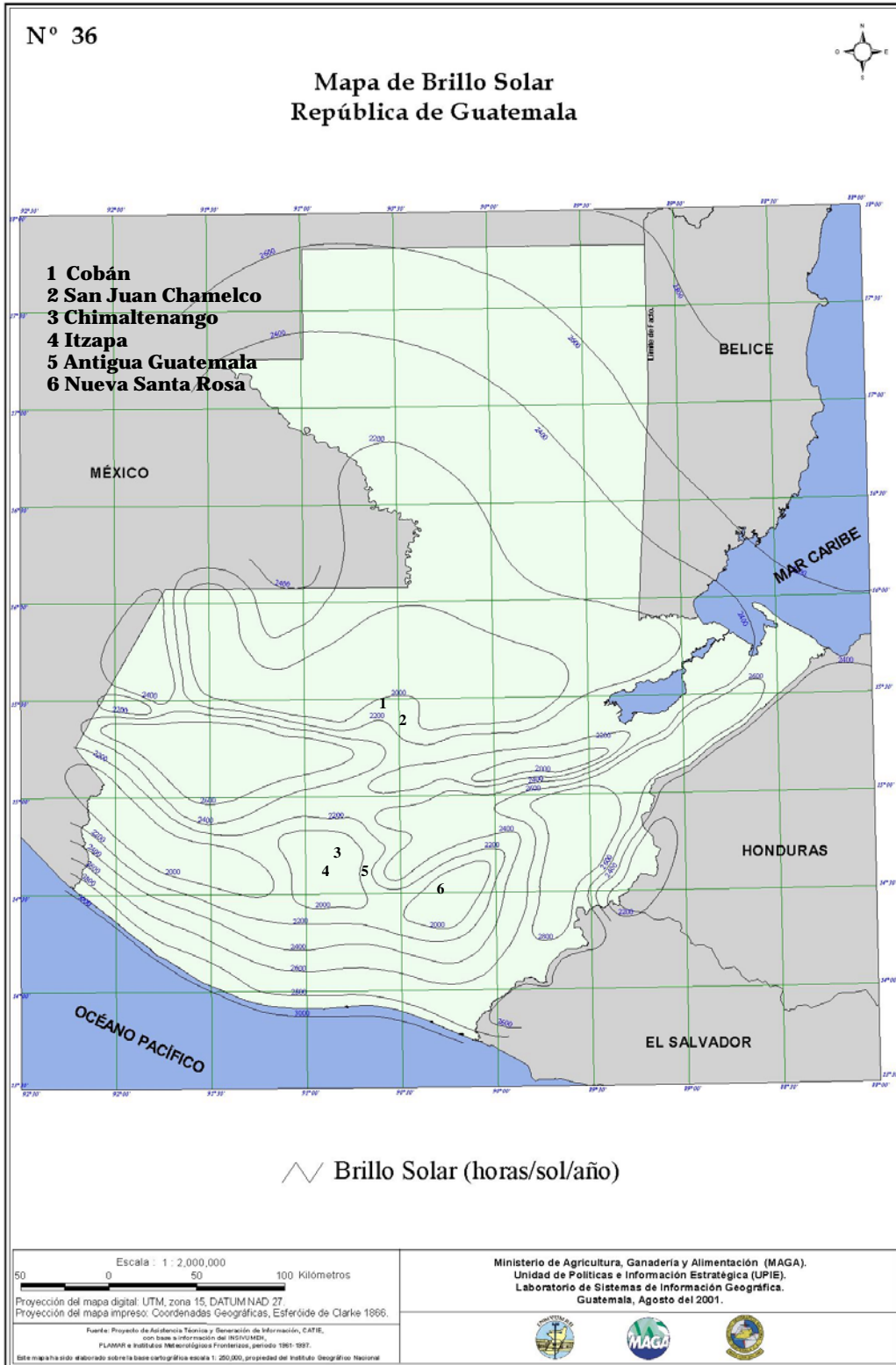


E. Leyenda mapa de serie de suelos, Simmons y otros 1959

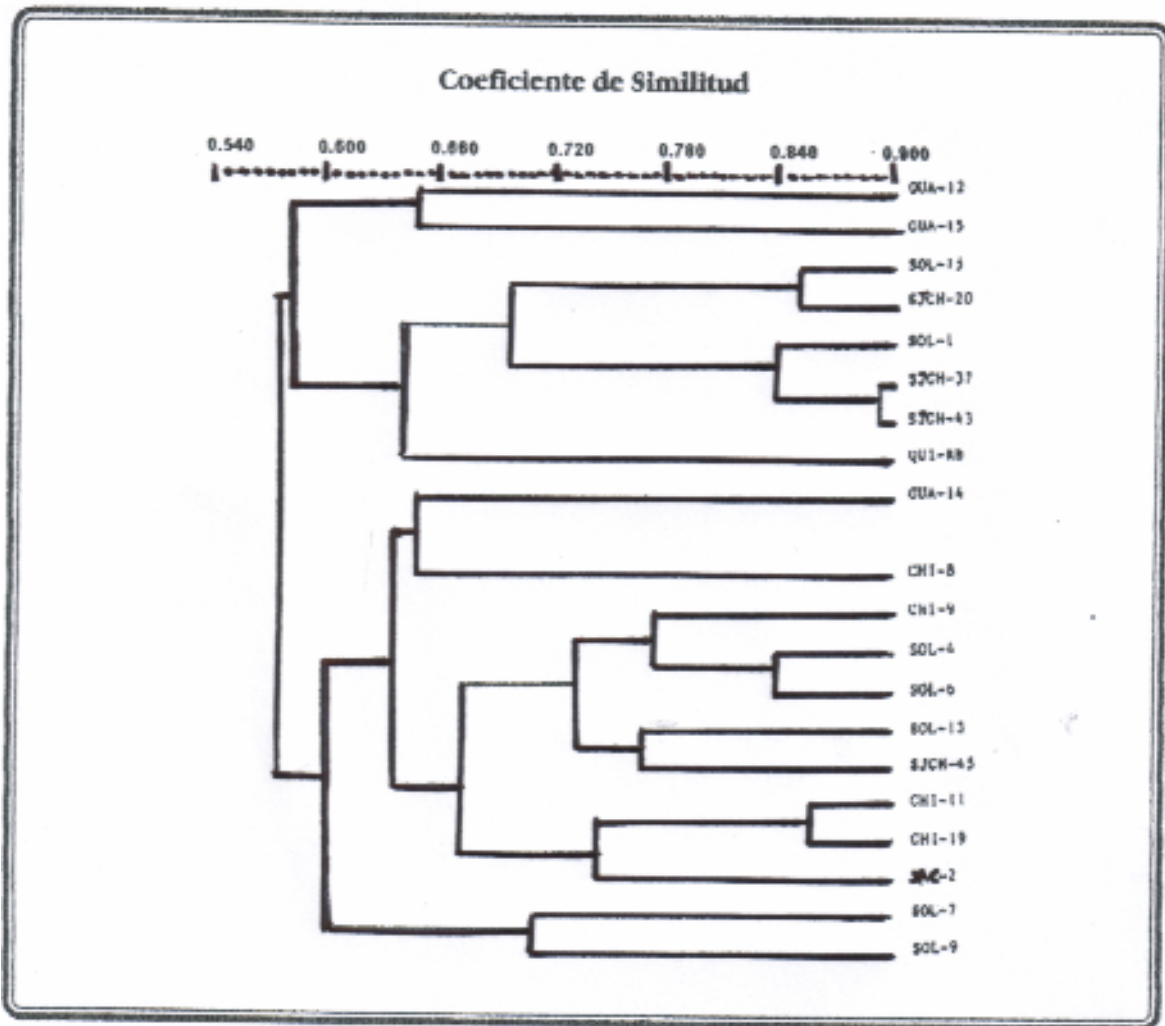
-	SERIE	MATERIAL ORIGINAL	RELIEVE	DRENAJE INTERNO	TEXTURA SUPERIOR	TEXTURA INFERIOR	RIESGO DE EROSION	POTENCIAL FERTILIDAD	pH PONDERADO
Cr	Carchá	Ceniza Volcánica	Ondulado a Ligeramente Ondulado	Bueno	Franco-Limosa a Franca Arcillosa	Franco-Limosa a Franco-Arcillo-Limosa	Regular a Bajo	Alto (pero tienen baja saturación de bases por el manejo)	5.5
Gt	Guatemala	Ceniza Volcánica	Plano u Ondulado	Bueno	Franco-Arcillosa a Arcilla	Arcilla a Franco-Arcillosa o Franco-Arcillo-Arenosa	Bajo (Alto en las zonas quebradas)	Alto	6.13
SV	Suelos de los valles		Valles						
Tc	Tecpán	Ceniza Volcánica	Suavemente Ondulado	Bueno	Franco-Arcillo-Arenosa	Franco-Arcillosa	Bajo	Regular	6.1

ANEXO 3.3

Mapa de brillo solar



ANEXO 4



Fenograma mostrando las relaciones entre diferentes muestras de injerto, *Pouteria viridis*, en el estudio de variabilidad genética usando isoenzimas como marcadores genéticos(44).

ANEXO 5

Injerto, bosque húmedo subtropical templado



Injerto, bosque húmedo montano bajo subtropical



Injerto, bosque húmedo subtropical frío

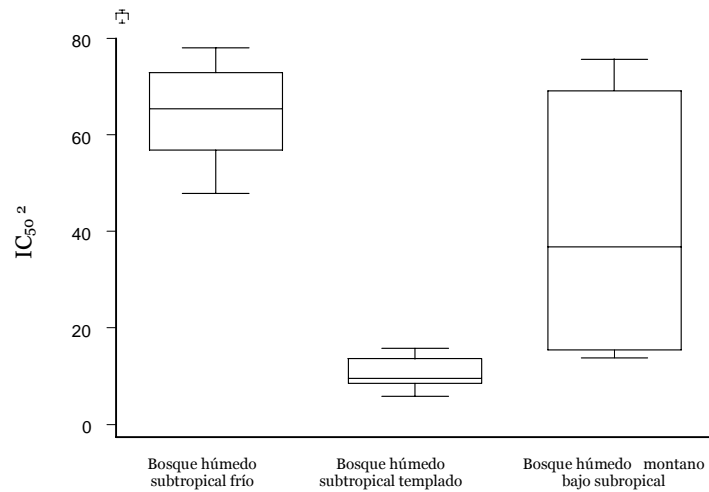


ANEXO 6

Gráficas del Test de Tukey

1. Gráficas de la actividad antioxidante total

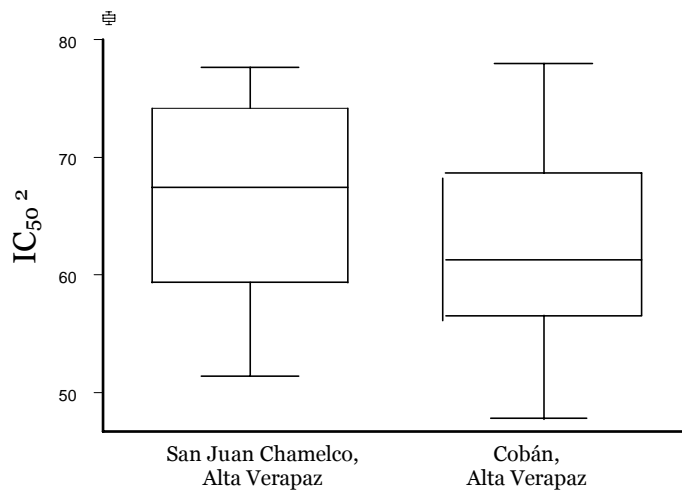
Gráfica 1. Comparación de la actividad antioxidante total de injertos cultivados en tres zonas de vida¹.



¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) de la actividad antioxidante total calculada en base fresca.

² Actividad antioxidante total expresada como miligramos de fruta fresca.

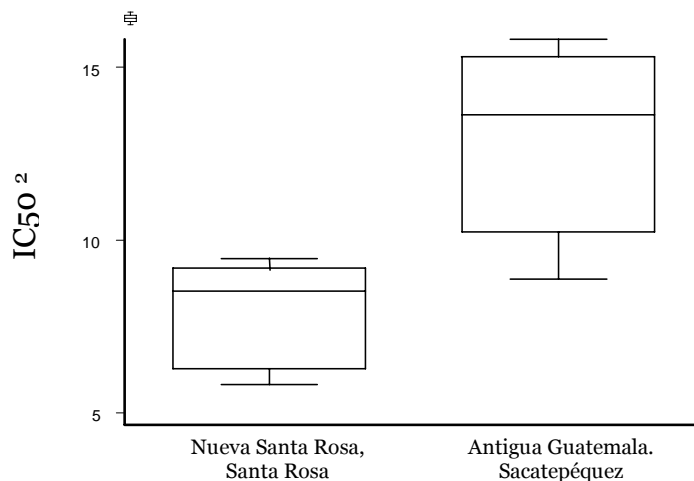
Gráfica 2. Comparación entre la actividad antioxidante total presente en los frutos de injerto de las localidades que componen el bosque húmedo subtropical frío¹.



¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) de la actividad antioxidante total calculada en base fresca.

² Actividad antioxidante total expresada como miligramos de fruta fresca.

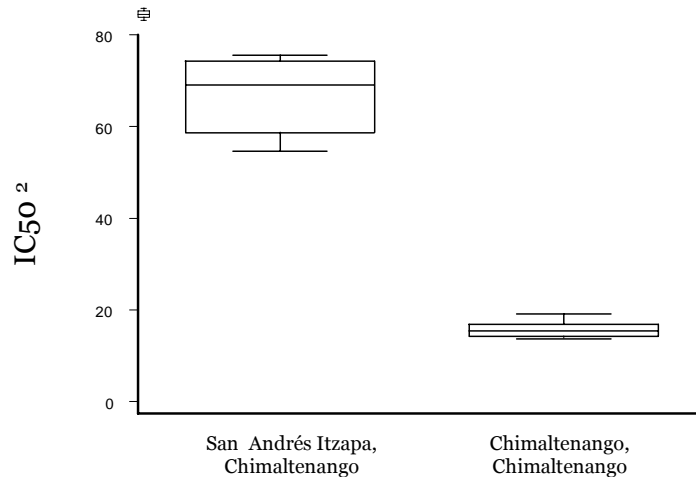
Gráfica 3. Comparación entre la actividad antioxidante total presente en los frutos de injerto de las localidades que componen el bosque húmedo subtropical templado¹.



¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) de la actividad antioxidante total calculada en base fresca.

² Actividad antioxidante total expresada como miligramos de fruta fresca.

Gráfica 4. Comparación entre la actividad antioxidante total presente en los frutos de injerto de las localidades que componen el bosque húmedo montano bajo subtropical¹.

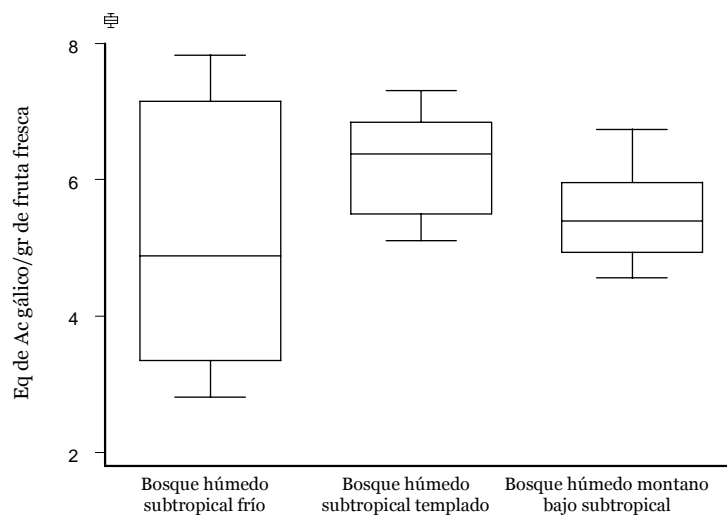


¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) de la actividad antioxidante total calculada en base fresca.

² Actividad antioxidante total expresada como miligramos de fruta fresca.

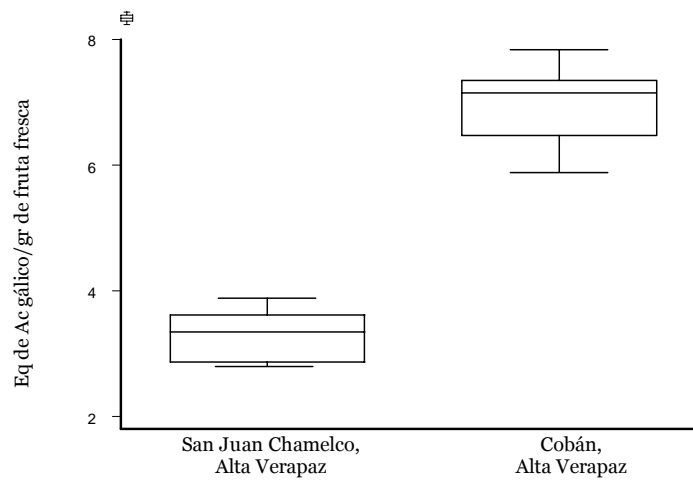
2. Gráficas del contenido de fenoles totales

Gráfica 5. Comparación de la cantidad de fenoles totales presentes en injertos cultivados en tres zonas de vida¹.



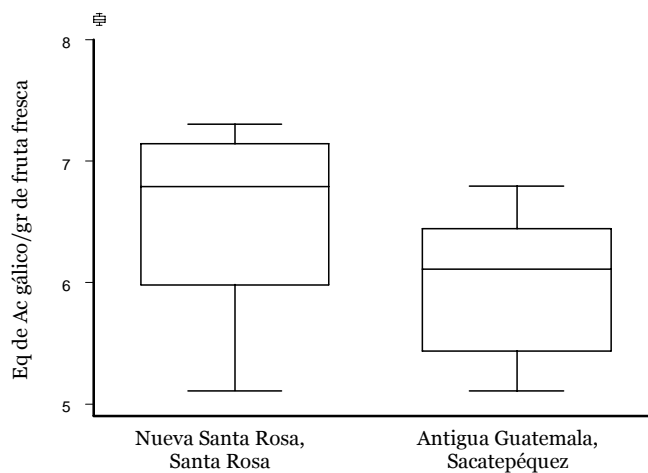
¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) del contenido de fenoles totales calculada en base fresca

Gráfica 6. Comparación de la cantidad de fenoles totales presente en los frutos de las localidades que componen el bosque húmedo subtropical frío¹.



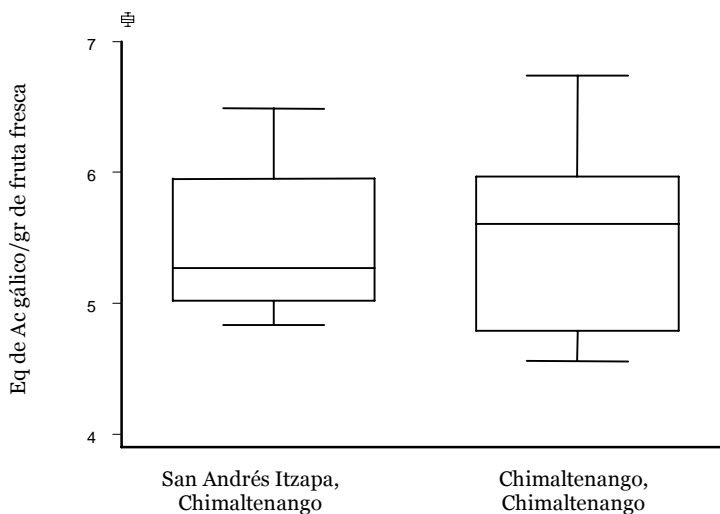
¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) del contenido de fenoles totales calculada en base fresca

Gráfica 7. Comparación de la cantidad de fenoles totales presente en los frutos de injerto de las localidades que componen el bosque húmedo subtropical templado¹.



¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) del contenido de fenoles totales calculada en base fresca

Gráfica 8. Comparación de la cantidad de fenoles totales presente en los frutos de injerto de las localidades que componen el bosque húmedo montano bajo subtropical¹.



¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) del contenido de fenoles totales calculada en base fresca

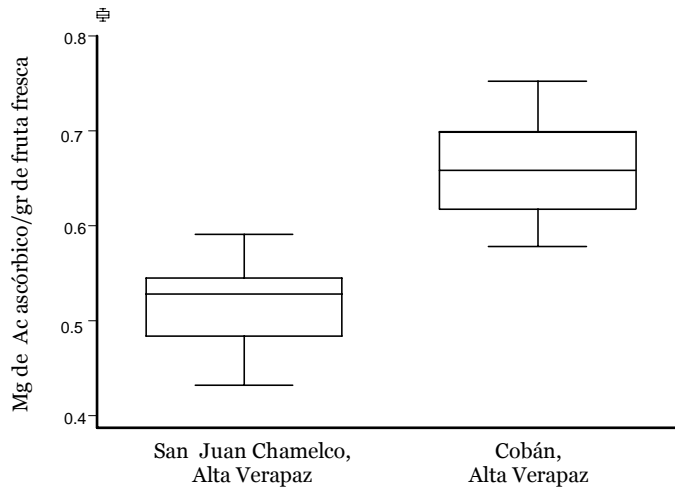
3. Gráficas del contenido de vitamina C

Gráfica 9. Comparación de la cantidad de vitamina C en injertos cultivados en tres zonas de vida¹.



¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) del contenido de vitamina C calculada en base fresca.

Gráfica 10. Comparación de la cantidad de vitamina C presente en los frutos de las localidades que componen el bosque húmedo subtropical frío¹.



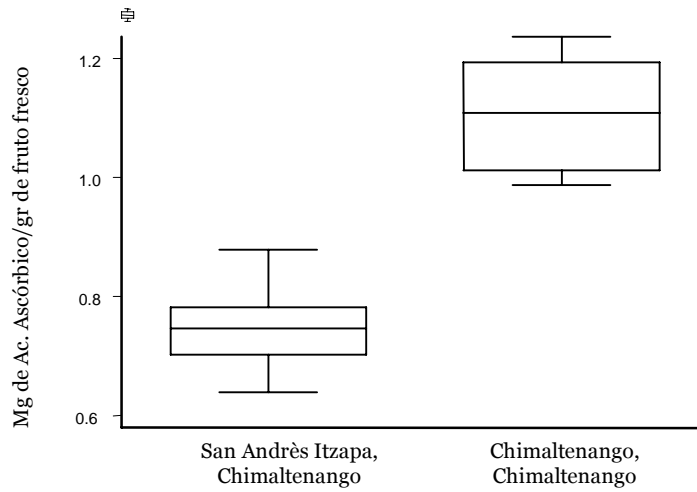
¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) del contenido de vitamina C calculada en base fresca.

Gráfica 11. Comparación de la cantidad de vitamina C presente en los frutos de las localidades que componen el bosque húmedo subtropical templado¹.



¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) del contenido de vitamina C calculada en base fresca.

Gráfica 12. Comparación de la cantidad de vitamina C presente en los frutos de las localidades que componen el bosque húmedo montano bajo subtropical¹.



¹ Test de tukey ($\alpha=0.05$) del contenido de vitamina C calculada en base fresca.